

影响反胶束体系萃取蛋白能力的因素及机理

赵晓燕¹, 薛文通², 陈复生^{3*}, 李里特²

(1. 清华大学材料科学与工程系, 北京 100084; 2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083;
3. 河南工业大学科研处, 河南 450052)

摘要: 该文对影响二-(2-乙基己基)琥珀酸酯磺酸钠(AOT)反胶束萃取蛋白能力的因素与机理进行了研究, 可以用来解释 AOT/异辛烷反胶束溶液分离萃取蛋白与油脂时, 萃取率变化的原因, 进一步了解反胶束分离萃取蛋白质分子的机理。试验结果表明随着反胶束体系中黏度增加, 微乳液增溶水量即水的物质的量与表面活性剂物质的量之比(W_0)增大时, 使得反胶束萃取蛋白与油脂的能力增强, 从而使萃取率升高。根据 Gibbs 吸附公式, 得出 AOT 浓度在 0.08 g/mL 时, 反胶束液具有较高的界面活性, W_0 值也较大, 有利于提取蛋白质。利用荧光光谱法和电导法研究 AOT 反胶束体系的结构, 可知 W_0 为 11~14 时, AOT 浓度大于 0.06 g/mL, 反胶束体系较稳定, 该体系是由渗透型和非渗透型的结合, 从而可以了解反胶束体系的相行为变化。

关键词: 反胶束, 蛋白, 黏度, 表面张力, 增溶水量, 电导率

doi: 10.3969/j.issn.1002-6819.2009.11.066

中图分类号: TS225.44

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2009)-11-0354-07

赵晓燕, 薛文通, 陈复生, 等. 影响反胶束体系萃取蛋白能力的因素及机理[J]. 农业工程学报, 2008, 25(11): 354-360.
Zhao Xiaoyan, Xue Wentong, Chen Fusheng, et al. Factors affecting reverse micelle extraction of protein and mechanism[J]. Transactions of the CSAE, 2009, 25(11): 354-360. (in Chinese with English abstract)

0 引言

反胶束(亦称反胶团)是将表面活性剂溶解在非极性有机溶剂中, 并使其浓度超过临界浓度, 碳氢链向外, 亲水基向内组成, 形成极性核内具有一定数量的水, 称为“水池”(water pool), 反胶束溶液中增溶水量(W_0)用反胶束增溶水分与表面活性剂的物质的量之比表示, 可通过含有适量盐的缓冲液来调节大小, 此“水池”具有能够溶解蛋白质和氨基酸等极性物质的能力, 具有自我组装的功能, 是热力学稳定和透明体系^[1]。反胶束溶液作为新的溶剂系统萃取生物分离技术, 已广泛用于膜模拟化学和蛋白质的液液萃取中, 特别是在含有油的植物蛋白质资源应用中, 可以同时分离蛋白质和油脂, 如在提取大豆中的蛋白质与油脂中的应用, 这一研究已成为在食品科学中研究的最大热点之一^[2-3]。

在反胶束形成中, 表面活性剂对形成反胶束尺寸的大小起着重要的作用, 许多表面活性剂都可以形成反胶束, 但研究应用最多的是阴离子表面活性剂二-(2-乙基己基)琥珀酸酯磺酸钠(AOT)。AOT 作为表面活性剂(临界胶束浓度为 $2.014 \times 10^{-3} \sim 2.975 \times 10^{-3}$ mol/mL^[4])分别溶于异辛烷、庚烷、正己烷、四氯甲烷等有机溶剂中所

形成的反胶束体系, 及其反胶束体系的动力学, 结构及“水池”大小等有不少学者已经进行了研究^[5-9]。

反胶束的特殊结构及性质, 使它可以作为一种很好的微反应器, 发生许多在水相中不可发生的化学反应。在反胶束中, 水分子以 3 种形式存在^[3,10]: 其一是溶解在反胶束中的水, 其特性类似于生物膜或蛋白质表面附近的水称为游离水(free water)或溶液水(bulk water); 其二是与表面活性剂极性头基结合的水称为结合水(bound water); 最后是在表面活性剂之间的水称为截留水(entrapped water)。游离水和结合水的极性、黏性, -OH 结合力随 W_0 增加而变化。此外, 反胶束中的游离水可以改变不同荧光探针的物理光学性质, 可以反应出“水池”的大小, 从而直接影响到蛋白质的萃取率及活性^[11]。Liu^[12], Li^[13], Mitra^[14]等利用电导率测定反胶束的物理化学性质, 研究反胶束体系结构。

在反胶束中, 蛋白质增溶到水池内的动力主要是依靠蛋白质分子表面所带净电荷与反胶束中表面活性剂极性头所带电荷相互作用, 疏水键及自由能等其他的作用, 所以, 任何能够影响这些作用的因素度将会对蛋白质萃取产生影响。有关文献报道其影响因素主要有: 表面活性剂浓度、反胶束的大小、水相中的离子强度、蛋白质分子的电荷及增溶水量等。因此, 反胶束的黏度、表面张力、 W_0 、电导率等因素对反胶束的静电作用、界面效应、电荷效应、疏水作用和自由能变化等产生影响, 从而在食品与生物工程中的应用。通过对反胶束动力学这些因素的研究, 有利于选择和制备较佳的反胶束体系分离萃取蛋白质等生物分子, 进一步提高对反胶束结构与性质的认识。特别有利于新型天然安全反胶束体系

收稿日期: 2008-10-31 修订日期: 2009-01-27

基金项目: 国家教育部科学技术重点资助项目(205094); 河南省杰出人才创新基金(0521000500)

作者简介: 赵晓燕(1975-), 博士, 主要从事食品加工新技术及生物粉体研究。北京 清华大学材料科学与工程系, Email: zhaoxy_2201@163.com

*通信作者: 陈复生(1963-), 男, 教授, 主要从事食品新资源开发。郑州 河南工业大学科研处, 450052。Email: Fushengc@yahoo.com.cn

的开发, 则可在油脂水解、植物蛋白和油脂的分离、发酵滤液的提取上实现工业化生产。

目前对 AOT/异辛烷反胶束进行动力学方面系统研究较少, 本文从反胶束的黏度、表面张力、 W_0 、电导率, 对 AOT/异辛烷反胶束体系萃取蛋白的能力进行研究。以期为选择适合分离萃取生物分子的反胶束体系提供科学依据, 更好地理解反胶束分离萃取过程的机理, 为反胶束体系同时分离萃取植物蛋白质和油脂的工程设计, 提供参考数据。

1 材料和方法

1.1 试验材料与设备

香豆素 343 (C343): 荧光级, Sigma Chemical Co., 二-(2-乙基己基)琥珀酸酯磺酸钠 (AOT)、异辛烷、无水乙醇、丙酮、卡尔·费休试剂等均为分析纯, 试验用水为二次蒸馏水。

ZSD—I 型自动水分测定仪 (上海安亭电子仪器厂); 移液枪 (德国 Eppendorf 公司); RF5300PC 荧光分光光度计 (日本 SHIMADZU 公司) K12 表面张力仪 (德国 KRuSS 公司); CEH-D (9VDC) 电导率计 (日本株式会社); 乌式毛细管黏度计 (黏度计规格内径为 $\phi 0.9 \sim 1.0$ mm, 上海启航玻璃仪器厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 AOT 反胶束体系增溶水量 (W_0) 及黏度的测定

1) 反胶束溶液中增溶水量 (W_0) 的测定

在滴定瓶中加入一定量的无水甲醇 (要求甲醇液面要超过电极的铂片, 约 20~30 mL), 用卡尔·费休氏溶液将甲醇中的水分滴去, 然后用微量进样器准确向甲醇溶液中加入 10 μ L 的蒸馏水, 再用卡尔·费休氏溶液将溶液滴至终点。从微量滴定管上准确读取所消耗的溶液量, 则卡尔·费休氏溶液的响应系数 A 为^[15]

$$A = \frac{\text{进样水分的质量(mg)}}{\text{消耗的卡尔·费休氏溶液体积(mL)}} \quad (1)$$

用微量进样器准确取反胶束溶液 100 μ L, 迅速加入甲醇溶液中, 并用卡尔·费休氏溶液将其滴定至终点, 在微量滴定管上准确读取所消耗的卡尔·费休氏溶液的体积。则反胶束溶液中所含水分的量为

$$m = A \times \text{消耗的卡尔·费休氏溶液的体积(mL)} \quad (2)$$

反胶束体系的性质常用参数 W_0 、 θ 和 n_{ag} 来表示^[16], 其中反胶束溶液中增溶水量 W_0 为水与表面活性剂的物质的量之比, θ 是往反胶束体系中添加含有适量盐缓冲液的量相对总体积的浓度, n_{ag} 是组成每个反胶束微粒的表面活性剂分子个数 (聚集数)。当 W_0 一定时, θ 与 n_{ag} 决定了反胶束微粒的相对浓度。其中最重要的参数为 W_0 , 反胶束溶液中 W_0 的计算式为

$$W_0 = \frac{\text{反胶束增溶水分的物质的量浓度(mol/L)}}{\text{反胶束溶液中表面活性剂的物质的量浓度(mol/L)}} \times 100\% \quad (3)$$

根据 Kinugasa^[8] 等的研究, “水池”直径 d_{wp} 满足以下

公式

$$d_{wp} = 0.25W_0 + 1.41 \text{ (nm)} \quad (4)$$

2) 不同浓度的 AOT 反胶束溶液的配制及黏度测定

称取一定质量的 AOT (准确至 0.1 mg), 配制其质量浓度分别为: 0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14、0.16 g/mL。移取 10 mL 经过玻芯漏斗过滤的纯溶剂异辛烷至黏度计中, 恒温 (25 ± 0.1) °C 下放置 10 min, 然后测定纯溶剂的流过时间 t_0 。将黏度计从恒温水槽中取出, 倒出溶剂, 烘干后, 用移液管从容量瓶中准确移取 10 mL AOT 反胶束溶液至黏度计中, 用体积稀释法测定不同浓度时反胶束溶液的流过时间 $t^{[17]}$ 。同时测量其 W_0 值。

利用乌式黏度计, 根据 Poiseuille 方程^[17], AOT 反胶束溶液和纯溶剂的黏度 η 和 η_0 可以按下式进行计算

$$\eta = k\rho t \quad (5)$$

$$\eta_0 = k\rho t_0 \quad (6)$$

式中: t , t_0 ——反胶束流体和溶剂的流动时间, s; k ——黏度计常数, $0.06101 \text{ mm}^2/\text{s}^2$; ρ ——溶剂的密度, 0.69 g/cm^3 。

相对黏度公式

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0} \quad (7)$$

增比黏度为

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \eta_r - 1 \quad (8)$$

AOT 反胶束微乳液的黏度与表面活性剂占整个乳液的流体力学体积分数相关, 表面活性剂所占的体积数可以反应出反胶束体系的配制是否适合于分离蛋白质与油脂, 即 AOT 分散相在介质中实际占的体积分数可适用于 Einstein 公式^[8]表示

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = 2.5\phi + 14.1\phi^2 + 1 \quad (9)$$

式中 ϕ ——相体积, 即表面活性剂占反胶束溶液的整个体积分数。

对反胶束溶液来说, 聚集数是直接影响到蛋白质的萃取率的一个参数, 当胶束在溶液中呈球状分散时, 所形成的聚集数可以按下式计算^[18]

$$n_{ag} = \frac{3V_w}{4\pi r_{wp}^3} \quad (10)$$

式中: r_{wp} ——反胶束中水滴的半径, nm; V_w ——水分子体积, mL。

在反胶束体系中, 通过表面活性剂的表面积可以得到反胶束体系是否是能形成均匀的反胶束聚集体。因此, 有必要对表面活性剂的表面积进行计算。根据一个简单的数学模型, 表面活性剂分子在反胶束体系表面所形成表面积 (A_s) 可以求出, 如下式^[8]

$$d_{wp} = \frac{6V_w W_0}{A_s} \quad (11)$$

1.2.2 在一定浓度的 AOT 反胶束溶液中不同增溶水量对黏度影响的测定

取60 mL 0.08 g/mL AOT反胶束液, 溶解不同体积的氯化钾浓度为0.05 mol/L的缓冲液 ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液, 调节pH值6.0~9.0), 加入体积分别为: 0、0.30、0.60、1.20、1.80、2.40、3.00 mL, 振荡形成反胶束溶液, 按照1.2.1测量反胶束中 W_0 和黏度。

据报道反胶束体系多表现为牛顿流体行为, 符合链式“硬球模型”, 黏度还可以通过公式(12)得到^[17]

$$\frac{\eta}{\eta_0} = \left(1 - \frac{\phi}{\phi_m}\right)^{[\eta]\phi_m} \quad (12)$$

式中: η ——反胶束溶液黏度, Pa·s; η_0 ——有机溶剂黏度, Pa·s; $[\eta]$ ——特性黏度, 对“硬球模型”, 其值为2.5; ϕ_m ——分散相即表面活性剂的最大堆积密度。

1.2.3 不同浓度的 AOT 反胶束溶液的表面张力的测定

取适量 1.2.1 中配制的不同浓度反胶束溶液 (0.04~0.14 g/mL), 采用片状测头测量反胶束溶液表面张力, 容器先用热纯净水清洗, 再用去离子水洗后, 用酒精灯烘干或用吹风机吹干, 每次测定, 测头先用丙酮清洗, 再用热纯净水洗, 再用去离子水清洗, 用酒精灯烘干。备测物在环境温度下静置 2 h, 以恒温 (室温 23.5℃), 溶液放入容器中, 容器与样液一起编号, 每一溶液测量 3 次, 记录其值 (每次测完清洗测头), 异辛烷作为空白液。在测量之前用去离子水校正仪器。根据 Gibbs 吸附公式^[9], 吸附量计算如下

$$\Gamma = -\frac{1}{RT} \cdot \frac{\partial \gamma}{\partial \ln c} \quad (13)$$

$$A_s = \frac{1}{N_A \Gamma_\infty} \quad (14)$$

式中: Γ ——吸附量, 表示单位面积表面相与含有同量溶剂的溶液相比所含溶质过剩之量, mol/cm²; γ ——表面张力, mN/m; R ——气体常数, 8.31 J/(mol·K); T ——温度, °C; $\ln c$ ——表面活性剂浓度的对数值, ln g/mL; N_A ——阿佛加德罗常数, 6.25×10^{23} 。

1.2.4 在 AOT 反胶束体系中香豆素 C343 的荧光光谱测定

1) 称取适量的荧光剂香豆素 C343, 溶于色谱级试剂无水乙醇中, 浓度为 10^{-3} mol/L。

2) 按照 1.2.1 配制不同浓度和增溶水量的 AOT 反胶束溶液。

3) 取上述配制好的样品液各 5 mL 放入试管中, 然后加入 $20 \mu\text{L}$ 10^{-3} mol/L C343 溶液, 混匀进行荧光测定。荧光测定条件: 波长扫描范围是 410~600 nm, 激发波长 410 nm, 发射波长 600 nm, 狭缝宽度 3 nm, 扫描速度 2 400 nm/min。所有样品液的测定重复 3 次, 在室温下测定。

1.2.5 AOT 反胶束溶液电导率的测定

按照 1.2.1 配制不同 AOT 浓度和 AOT 一定浓度 (0.08 g/mL) 下不同增溶水量的反胶束溶液。电导率的测定通过 CEH-D (9VDC) 数显电导计测量。取一定量的 AOT 反胶束溶液 (30 mL) 放入 50 mL 三角瓶内, 然后插入电极, 待数字稳定后记录电导率值, 测定之前用去

离子水校正。所有样品在室温下测定重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 AOT 反胶束溶液增溶水量与黏度

不同浓度 AOT 反胶束溶液的增溶水量、“水池”直径与黏度见表 1。相对黏度是两种液体黏度的比值, 即 AOT 溶液的动力黏度与同温度下纯溶剂的动力黏度之比。相对于溶剂, 溶液黏度增加的分数的称为增比黏度。

表 1 不同浓度的 AOT 反胶束溶液的增溶水量(W_0)与黏度
Table 1 Moisture (W_0) and viscosity of AOT reverse micelle with different concentrations

AOT 反胶束质量 浓度(g·mL ⁻¹)	增溶水量 (W_0)	水池直径(d_{wp})/ nm	相对黏度	增比 黏度
0.01	0	1.41	1.02±0.005	0.02
0.02	1	1.66	1.05±0.002	0.05
0.04	2	1.91	1.07±0.002	0.07
0.06	3	2.16	1.10±0.002	0.10
0.08	4	2.45	1.13±0.004	0.13
0.10	6	2.01	1.15±0.004	0.15
0.12	7	3.16	1.21±0.002	0.21
0.14	8	3.41	1.27±0.002	0.27
0.16	9	3.66	1.32±0.0004	0.32

从表 1 中可以得出, 随着表面活性剂 AOT 浓度增加, 黏度也随之增加; W_0 的值增大, 可增加反胶束的数量, 从而增大对蛋白质的溶解能力。但表面活性剂浓度过高时, 有可能在溶液中形成比较复杂的聚集体, 同时会增加反萃取过程的难度。因此, 应选择蛋白质萃取率最大时的表面活性剂浓度为最佳浓度。当 AOT 质量浓度为 0.01 与 0.02 g/mL 时, 其 W_0 值分别为 0 与 1, 根据公式 (11) 可知, AOT 表面活性剂的表面积分别为 0 与 0.09 nm^2 , 低于 AOT 表面活性剂一条疏水链交叉部分的面积 0.21 nm^2 , 说明在较低的 W_0 时, 在油相和水池的界面是不均匀的, 即 $W_0 < 2$ 时, AOT 在有机相中不能形成均匀的反胶束聚集体^[8]。因此配制 AOT 反胶束体系, 其 AOT 的浓度必须高于 0.04 g/mL。有关文献^[20]也报道通常聚集数随着表面活性剂浓度的增加而增加, 但浓度很大时, 使胶团溶液的整体极性增大, 从而降低偶极子-偶极子相互作用。因此, 随浓度的增加, 聚集数的增加一般趋于平缓, 聚集数趋于恒定。

从图 1 中可以得出: 在一定浓度的 AOT 反胶束中, 黏度随着 W_0 的增大而增大。证明了反胶束中黏度不仅仅与加入表面活性剂的浓度有关, 而且与 W_0 也密切相关, 在一定范围内是成正比关系的。Gochman-Hecht^[21]等认为 AOT/异辛烷反胶束在 W_0 较低时, 反胶束体系属于非牛顿流体, 通过小角 X 射线散射 (SAXS) 试验得到反胶束溶液的“水池”形状是球形的; 随着 W_0 的增大, 黏度增大, 其形状发生了改变, 出现了棒状和层状结构, 也可能形成囊泡或双层胶团, 且胶束聚集数增加, 从而提高了反胶束溶液的稳定性, 则有利于提取蛋白质。由公式 (12) 可以得出的黏度值与所测的黏度值相符, W_0 值越大, ϕ_m 越大, 反胶束溶液的黏度也越大。由此可以得出, W_0 可

以用来反映反胶束溶液聚集数及黏度的变化。但是, 加入过多的水, 将会增强水与界面相作用, 破坏反胶束溶液结构, 导致反胶束出现分相现象。

试验证明, 表面活性剂的浓度影响了反胶束体系的 W_0 值、黏度及胶团的形状, 进而影响到反胶束体系中的聚集数及“水池”直径。 W_0 值也可以用来反映反胶束溶液聚集数及黏度的变化, 一定程度上可以反映出反胶束的大小。

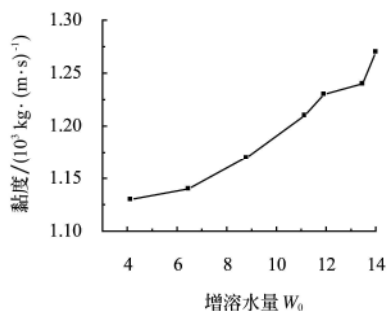


图 1 0.08 g/mL AOT 反胶束中不同 W_0 对黏度的影响
Fig.1 Effects of different W_0 values on viscosity of 0.08 g/mL AOT reverse micelle

2.2 不同浓度 AOT 反胶束溶液的表面张力

图 2 是 AOT/异辛烷反胶束溶液的表面张力与其浓度的关系曲线。由图可知, 随着 AOT 表面活性剂浓度的增大, 其表面张力也逐渐上升, 当表面张力在 AOT 浓度为 0.08 g/mL 达到最大值, 然后表面张力开始下降, 表明在表面活性剂 AOT 浓度在 0.08 g/mL 时的反胶束液具有较高的界面活性。

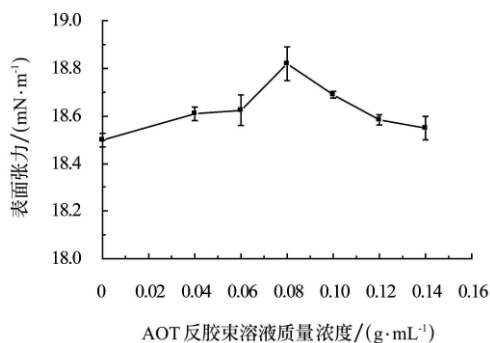


图 2 AOT 反胶束溶液浓度与其表面张力的关系
Fig.2 Relationship between the concentration and surface tension of AOT reverse micelle

根据公式 (13、14) 可知, AOT 表面活性剂在界面饱和和吸附量与 AOT 在界面的表面积。Gibbs 公式表明, 若表面张力随溶液浓度升高而降低, $\frac{\gamma}{\ln c}$ 为负值, 吸附量为正值, 这是表面活性物质情形; 若表面张力随着浓度增加而升高, $\frac{\gamma}{\ln c}$ 为正值, 吸附量为负值, 这是表面非活性物质的情形。这表示表面活性物质溶液表面层中表面活性剂的浓度应大于内部, 而表面非活性物质溶液表面上溶剂所占的比例将大于溶液内部的比例。图 3 是 AOT 吸附量与 AOT 浓度之间的关系曲线, 是一条很好的

Languir 吸附等温线。由该曲线即公式 (14) 可以得到 AOT 不同浓度下的表面积, 随着表面活性剂浓度的增加而减少, 当 AOT 质量浓度大于 0.10 g/mL 时面积变化不大。面积越小, 由公式 (11) 可知 W_0 较大, 说明水化作用越强, 吸附在异辛烷/水界面中的 AOT 伸入水一侧更多一些。通过表面张力试验, 说明了微乳体系中界面张力与相体积或增容量存在相关性, 且表面活性剂的浓度对反胶束体系中的表面张力有影响, 通过表面张力值的大小, 可以知道反胶束溶液是否适合用来提取分离植物蛋白与油脂。当 AOT 反胶束中的表面张力为 18.82 mN/m 时, 为合适提取分离植物蛋白的值。

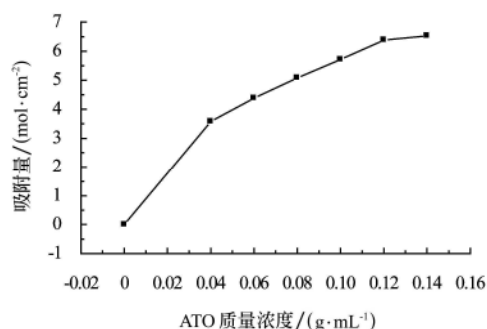


图 3 AOT 的界面吸附量与浓度的关系
Fig.3 Interfacial absorption amount of AOT versus its concentration

2.3 在 AOT 反胶束体系中香豆素 C343 的荧光光谱测定结果

1) 在不同浓度的 AOT 反胶束溶液中 C343 光谱的测定

根据 2.1 的结果, 得出表面活性剂 AOT 的质量浓度在 0.04 g/mL 才可以形成均一反胶束体系, 质量浓度在 0.14 g/mL 与 0.16 g/mL 的 W_0 变化不大, W_0 相差为 1。由此我们在用荧光光度法研究在反胶束中香豆素 C343 的荧光光谱时, 采用表面活性剂 AOT 的浓度从 0.04~0.14 g/mL, 图 4 显示了不同浓度的 AOT 反胶束中 C343 的荧光光谱图, 图 5 展示了在不同 AOT 浓度下的“水池” W_0 值与波峰位移对应关系。荧光光谱在 410 nm 处作为激发波长, 从图 4 中可以清晰的看出, C343 的动态荧光光谱将随着 AOT 反胶束的不同浓度发生位移, 表面活性剂质量浓度在 0 到 0.04 g/mL 时, 波长位移较大, 移动了 39 nm, 意味着荧光探针香豆素 C343 进入到反胶束的“水池”中^[10], 然后波谱位移随着表面活性剂浓度逐步增加, 在表面活性剂质量浓度为 0.10 g/mL 时, 波谱位移值较少, 说明反胶束中“水池”的极性与乙醇的极性一样。荧光强度随着 AOT 浓度的增加而降低, 降低幅度不大, 在低浓度的反胶束中荧光强度比在非反胶束中的强。通过试验还可以得出, 随着 AOT 浓度的增加, 其 W_0 增大, 在反胶束的内核, AOT 的头基与 C343 的 -OH 作用增强, 引起 C343 去质子化, 即当 C343 被反胶束溶液吸收时, C343 分子被增溶在反胶束内核, 并且以阴离子的形式存在, 从而引起峰的波长发生了位移 (如图 5)。因此, 很容易区分增溶于反胶束内与外的染料分子, 并且可以比

较染料分子增溶于反胶束液的极性和分散在非极性相的程度^[5]。由此可以得出,当表面活性剂加入到非极性溶剂中时,将会引起 W_0 的改变,当表面活性剂浓度在大于 0.04 g/mL 时可以形成稳定的反胶束体系,聚集数主要依赖于表面活性剂的含量。

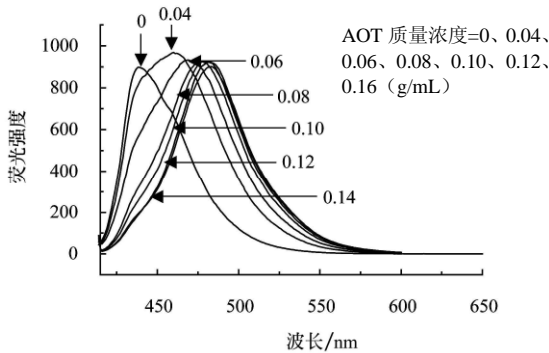


图4 不同浓度的 AOT 反胶束溶液中 C343 的荧光光谱
Fig.4 Fluorescence spectra of C343 in AOT reverse micelles with different concentrations

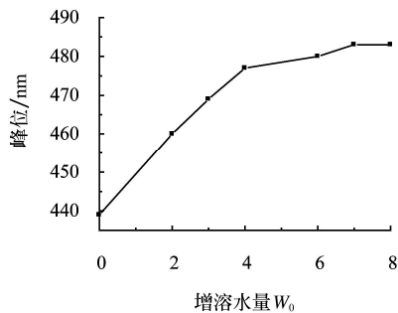


图5 C343 在 AOT/异辛烷反胶束中荧光峰的位置与 W_0 函数关系

Fig.5 Fluorescence peak location of C343 in AOT/isooctane reverse micelle as a function of W_0

2) 在不同 W_0 值的反胶束中香豆素 C343 光谱测定
为了确信在非极性溶液中的反胶束构成与特性,对反胶束液中不同的 W_0 值进行了荧光光谱研究。结果如图 6 所示,这个光谱图展示了反胶束“水池”直径从小到大的荧光强度及位移,随着 W_0 的增大,波谱发生位移,荧光光谱图没有明显的等色点,说明波长发生位移的主要原因是来自反胶束体系微环境的变化,而不是来自 C343 两种形式竞争的变化,如质子化和去质子化形式,其在反胶束体系是以阴离子的形式存在。 W_0 值从 4 到 14.00 时,峰的波长发生位移,特别是在 $W_0=11$ 时,可明显观察到最大波峰发生位移,当 W_0 值大于 14.00 时,这种变化率较小。这种变化意味着,荧光探针周围的环境变得较极性了。荧光强度随 W_0 增加而轻微降低,原因与上述 1) 中的一样。随着 W_0 值的增加,反胶束中的游离水增加,结合水利用香豆素 C343 吸引力与表面活性剂分子的极性基结合,导致这些水分子与“水池”中的水分相比移动较慢^[10]。Yamasaki^[9]等认为当 $W_0 > 15$ 时,波峰的波长相当于在游离水中的位置,这可以认为随着“水池” W_0 的增大,非结合水增加,反胶束溶液中“水池”

的极性增加,荧光探针逐渐移向含水较多的位置,试验结论与此相符。这个结果进一步论证了,在“水池” W_0 小于 15 和大于 11 的环境时,峰移较容易区分。通过试验可以得出,在 W_0 在 11~14 时,峰的波长比较稳定,形成稳定的反胶束微乳液,其“水池”直径比较大,有利于反胶束对蛋白质的萃取;若加入极性物质,其在反胶束外的浓度增加,而反胶束体系“内核”将保持不变,如果持续的添加极性物质,将会出现两相分离,破坏反胶束体系的结构^[5]。研究表明,反胶束中“水池”的直径除受水/表面活性剂的影响外,主要由反胶束增溶水分与表面活性剂的摩尔浓度之比决定。

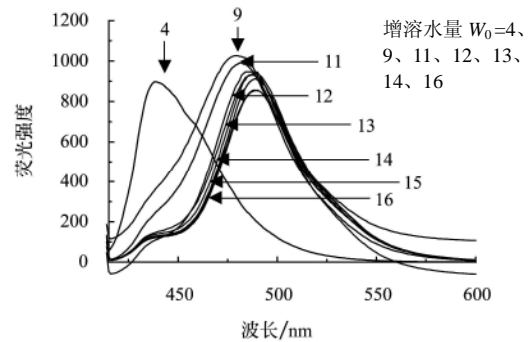


图6 C343 在质量浓度为 0.08 g/mL 水/AOT/异辛烷反胶束团在 $W_0=4 \sim 16$ 范围内的荧光光谱

Fig.6 Fluorescence spectra of C343 in water/AOT/isooctane reverse micelle with the range of W_0 values from 4 to 16

2.4 AOT 反胶束电导率的测定结果

不同浓度 AOT 反胶束体系的电导率特性如图 7 所示。反胶束溶液的电导率在某种程度上反映了反胶束溶液的结构。反胶束溶液中的电导率不同于以水为连续相的溶液,在反胶束溶液中含有少量的水,造成溶液的电导率较差,一般小于 $1 \mu\text{S}/\text{cm}$ ^[22]。

图 7 可知,随着反胶束溶液中 AOT 浓度的增大,电导率也随着增大。原因是在反胶束体系中表面活性剂含量增大, W_0 也增大,增多了胶团的聚集数,随着胶团之间碰撞增加,促进胶团之间的渗透作用,导致电导率增大^[23]。

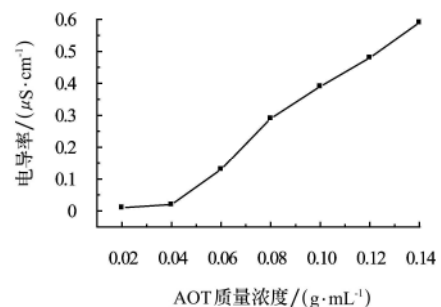


图7 AOT/异辛烷反胶束溶液电导率与浓度的关系

Fig.7 Relationship between conductivity of AOT/isooctane reverse micelle and its concentration

测量 AOT/异辛烷/ H_2O 的电导率- W_0 曲线,如图 8 所示。电导率随着 W_0 的增加而增大,当到达一个最大值,

将随着 W_0 值增大而减小。这种现象可以用电导率渗透理论来分析, 当反胶束液滴的体积数, W_0 达到一定的值时, 单个液滴之间的相互作用增加, 微乳颗粒最终形成簇。电荷载体通过这些簇在电场中运动, 形成刚性弱的界面, 表面活性剂及盐离子的迁移率增加, 渗透性增强, 水便能够进入内核, 封闭的颗粒会融合在一起以至形成通道, 盐离子便在该通道内传输, 结果导致电导率增强^[24-25]。当 $W_0 > 14$ 时, 电导率呈下降的趋势, 通常认为是电场中带电荷液滴运动的结果^[12], 随着 W_0 增大, 界面的刚性增强, 渗透性减弱, 增加的水被迫分散于颗粒间, 其结果是单相反胶束体系变成一种多分散相, 体积增大。同时, 随着增溶水量的增加, 最终出现相分离, 微乳液颗粒运动速度降低, 导致电导率的降低^[23]。

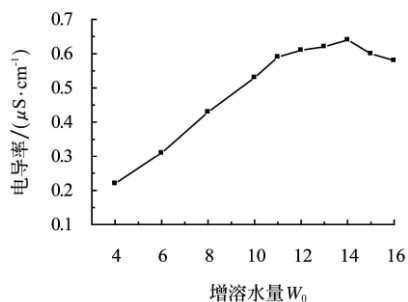


图 8 AOT/异辛烷反胶束溶液中电导率随 W_0 变化而变化
Fig.8 Variation of conductivity with W_0 in AOT/isooctane reverse micelle

此外, 随着 W_0 增大到一定程度, 胶团将会膨胀遭到破坏, 表面活性剂在反胶束液中的扩散将随之减慢, 电导率又随之降低^[26]。因此, 电导率在一定的程度上可以反映出反胶束的结构变化, 即微乳液的相行为变化。

3 结 论

1) 表面活性剂在形成反胶束溶液时, 反胶束溶液黏度对其 W_0 、聚集数, 胶束大小及反胶束的形状都会产生影响, 从而反胶束对植物蛋白质与油脂分离萃取率产生影响。因此, 配制反胶束溶液时黏度也是一个不可以忽视的因素。

2) AOT 反胶束的表面张力与其浓度关系密切相关, 得出 AOT 质量浓度在 0.08 g/mL 时, 具有较高的表面活性, 吸附量和分子截面积随着反胶束浓度的增大而增加, 当质量浓度大于 0.08 g/mL 时, 变化不大。通过表面张力试验, 说明了微乳体系中界面张力与相体积或增溶量存在相关性, 当表面活性较高时, 有利于反胶束体系分离萃取植物蛋白质与油脂。

3) 通过荧光光谱试验可以得出, 表面活性剂质量浓度在 0.08~0.10 g/mL, W_0 在 11~14 时, 峰的波长比较稳定, 形成稳定的反胶束微乳液, 其“水池”直径比较大, 形成聚集数较多, 有利于反胶束对蛋白质的萃取; 若加入极性物质, 其在反胶束外的浓度增加, 而反胶束体系“内核”将保持不变, 如果持续的添加极性物质, 将会出现两相分离, 破坏反胶束体系的结构。

4) 电导率测量表明, AOT 反胶束体系是由渗透型

和非渗透型的结合。通过反胶束中电导率的测定, 可反应出反胶束的结构性能与相行为变化, 适合于用来解释反胶束的萃取蛋白质分子与油脂的机理。

[参 考 文 献]

- [1] Luisi P L, Giomini M, Pileni M P, et al. Reverse micelles as hosts for protein and small molecules[J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 1988, 947(1): 209-246.
- [2] Leser M E, Kristina R., Luide P. The use of reverse micelles for the simultaneous extraction of oil and protein from vegetable meal[J]. *Biotechnology Bioengineering*, 1989, 34(11): 1140-1146.
- [3] 赵晓燕, 陈复生, 薛文通. 不同反胶束提取大豆蛋白质的研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(4): 109-111.
Zhao Xiaoyan, Chen Fusheng, Xue Wentong. Study on soybean protein extraction in different reverse micelles[J]. *Food Science*, 2007, 28(4): 109-111. (in Chinese with English abstract)
- [4] 温宝妹. 微乳液中结晶紫碱性退色反应的动力学研究[D]. 兰州: 兰州大学化学系, 2002.
Wen Baomei. Study on the Kinetics of Alkaline Fading of Crystal Violet in Microemulsions[D]. Lanzhou: Department of Chemistry, University of Lanzhou, 2002. (in Chinese with English abstract)
- [5] 高亚辉, 陈复生, 赵俊廷, 等. 反胶束萃取大豆蛋白反萃取过程的动力学研究[J]. *农业工程学报*, 2007, 23(7): 206-211.
Gao Yahui, Chen Fusheng, Zhao Juntong, et al. Research progress of kinetics on reverse micelle extraction protein[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2007, 23(7): 206-211. (in Chinese with English abstract)
- [6] Narayanan S S, Sekhar Sinha S, Sarkar R, et al. Picosecond to nanosecond reorganization of water in AOT/lecithin mixed reverse micelles of different morphology[J]. *Chemical Physics Letters*, 2008, 452(1/2/3): 99-104.
- [7] Freda M, Onori G, Paciaroni A, et al. Elastic scattering investigation of AOT-D₂O-CCl₄ systems in the reverse micellar phase[J]. *Chemical Physics Letters*, 2001, 348(9): 311-316.
- [8] Kinugasa T, Kondo A, Nishimura S, et al. Estimation for size of reverse micelles formed by AOT and SDEHP based on viscosity measurement[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2002, 204(1/2/3): 193-199.
- [9] Yamasaki T, Kajimoto O, Hara K. High-pressure studies on AOT reverse micellar aggregate by fluorescence probe method[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2003, 156(1/2/3): 145-150.
- [10] Hazra P, Sarkar N. Intramolecular charge transfer processes and salvation dynamics of coumarin 490 in reverse micelles [J]. *Chemical Physics Letters*, 2001, 342(9): 303-311.
- [11] Correa N M, Durantini E N, Silber J J. Substituent effects on binding constant of carotenoids to n-heptane/AOT reverse micelles[J]. *Journal of Colloid and interface Science*, 2001, 240(2): 573-580.
- [12] Liu D J, Ma J M, Cheng H M, et al. Investigation on the conductivity and microstructure of AOT/non-ionic surfactants/water/n-heptane mixed reverse micelles[J]. *Colloids and*

- Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 1998, 135(1/2/3): 157—164.
- [13] Li Q, Li T, Wu J G. Electrical conductivity of water/sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate/n-heptane systems: the influence of water content, bis(2-ethylhexyl) phosphoric acid, and temperature[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2001, 239(2): 522—527.
- [14] Mitra R K, Paul B K. Investigation on percolation in conductance of mixed reverse micelles[J]. *Colloids Surface A*, 2005, 252(2/3): 243—259.
- [15] 黄伟坤. 食品检验与分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1989.
Huang Weikun. Food determination and analysis[M]. Beijing: China Light Industry Publisher, 1989. (in Chinese)
- [16] 朱浩, 施翥, 范映辛, 等. 反向胶束体系中的酶学研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1998, 25(3): 204—209.
Zhu Hao, Shi Nai, Fang Yngxin et al. Study on enzyme in reverse micelles[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1998, 25(3): 204—209. (in Chinese with English abstract)
- [17] 陈惠钊. 黏度测量 [M]. 北京: 中国计量出版社, 2003.
Chen Huizhao. Viscosity Measurement[M]. Beijing: China Jiliang Publisher, 2003. (in Chinese)
- [18] Anarbaev R O, Khodyreva S N, Zakharenko A L, et al. DNA polymerase activity in water-structured and confined environment of reverse micelles[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2005, 33(1/2): 29—34.
- [19] 顾惕人, 朱步瑶, 李外郎, 等. 表面化学[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
Gu Tiren, Zhu Buyao, Li Wailang et al. Surface chemistry[M]. Beijing: Science Publisher, 2003. (in Chinese)
- [20] 崔正刚, 殷福珊. 微乳化技术及应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
Cui Zhenggang, Yin Fushan. Microemulsion technology and application[M]. Beijing: China Light Industry Publisher, 1999. (in Chinese)
- [21] Gochman-Hecht H, Bianco-Peled H. Structure of AOT reverse micelles under shear[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005, 288(1): 230—237.
- [22] Krauel K, Davies N M, Hook S, et al. Using different structure types of microemulsions for the preparation of poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles by interfacial polymerization[J]. *Journal of Controlled Release*, 2005, 106(1/2): 76—87.
- [23] Paul B K, Mitra R K. Conductivity of reverse micellar systems of water/AOT + Brij-56 or Brij-58/IPM and their percolation under varied concentrations of amphiphiles and different additives[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemistry Engineer Aspects*, 2006, 273(1/2/3): 129—140.
- [24] Gardner A, V´asquez V R, A. Clifton A et al. Molecular dynamics analysis of the AOT/water/isooctane system: Effect of simulation time, initial configuration, and model salts[J]. *Fluid Phase Equilibria*, 2007, 262(1/2): 264—270.
- [25] Maltra A, Mathew C, Varshney M. Close and open structure aggregates in microemulsion and mechanism of percolative conduction[J]. *Journal of Physical Chemistry*, 1990, 94(13): 5290—5292.
- [26] Fanun M, Al-Diyn W S. Electrical conductivity and self diffusion-NMR studies of the system: Water/sucrose laurate/ethoxylated mono-di-glyceride/isopropylmyristate[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineer Aspects*, 2006, 277(1/2/3): 83—89.

Factors affecting reverse micelle extraction of protein and mechanism

Zhao Xiaoyan¹, Xue Wentong², Chen Fusheng^{3*}, Li Lite²

(1. Department of Material Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

2. College of Food Science and Nutrition Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

3. Scientific Research Department, Henan University of Technology, Henan 450052, China)

Abstract: The study was focused on the factors affecting AOT reverse micelle extraction of protein and mechanism, which could explain the reason for the extraction yield changes when extracting and separating protein and oil from AOT reverse micelle, and could further understand the mechanism of separation biomolecules using reverse micelle extraction. The results indicated that the molar ratio of water to surfactant (W_0) increased with the increase of the viscosity of reverse micelle, and the capacity of extracting protein and oil from reverse micelle increased. According to Gibbs formula, it was concluded that reverse micelle of 0.08 g/mL AOT showed the higher interface activity and moisture (W_0), which was in favor of the protein and oil extraction in reverse micelle. The structure of reverse micelle was investigated by fluorescence spectra and conductivity methods. The results showed that the reverse micellar system was quite stable at $W_0=11\sim 14$, $[AOT]\geq 0.06$ g/mL, and the AOT reverse micelle system seemed a combination type of a nonpercolation system and a percolation system, and the conductivity could reflect the changes of reverse micelle phase.

Key words: reverse micelles, protein, viscosity, surface tension, moisture, conductivity