

双水相萃取技术研究新进展

胡松青 李琳 郭祀远 陈玲 蔡妙颜

(华南理工大学食品与生物工程学院, 广东 广州 510640)

摘要:介绍了双水相萃取技术(ATPE)在生物工程下游工程中的应用现状,综述了近年来 ATPE 相关研究的进展。为了提高 ATPE 的选择性和分离效率,不但发展了热分离聚合物体系和表面活性剂混合体系等新型双水相系统(ATPS),而且在组成传统 ATPS 的聚合物上耦联亲和配基的亲和 ATPS 也得到发展。与物理场作用、其他分离技术和生物过程的集成克服了单一 ATPE 的某些不足,是 ATPE 的发展方向。常规萃取设备和连续化操作技术在 ATPE 中的应用标志着其工业化日趋成熟,但建立溶质在 ATPS 中分配的热力学模型和相关理论有待进一步完善。

关键词:双水相萃取;生物工程;分离与纯化

中图分类号:TQ028.8

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2004)06-0022-04

Advances on aqueous two-phase extraction

HU Song-qing, LI Lin, GUO Si-yuan, CHEN Ling, CAI Miao-yan

(College of Food and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The applications of the aqueous two-phase extraction (ATPE) in these years were summarized, and the advances on the research of ATPE were reviewed. In order to improve the selectivity and separation efficiency, not only the novel aqueous two-phase systems (ATPS) such as thermoseparating polymer system and surfactant mixture system were developed, but also the affinity extraction using ATPS which links affinity ligand to polymer in traditional ATPS got progressed. The integration with related techniques (physical field, other separation techniques, biological processing) was the development direction of ATPE, which overcame some shortcomings in single ATPE. Although the application of the conventional extraction equipments and continuous operation technique in ATPE indicated that the industrializations of APTE were growing up, establishing the thermodynamic models and theories about the partitioning of solute in ATPS need to be optimized.

Key words: aqueous two-phase extraction; biological engineering; separation & purification

在各种新型分离纯化技术中,双水相萃取(ATPE)备受各国学者的重视,被认为是生物下游工程中一种极有前途的初级分离单元操作。双水相萃取系统(ATPS)是一种或几种物质在水中以适当的浓度溶解,在一定条件下形成互不相溶的水溶液系统。通过溶质在两水相之间分配系数的差异而进行萃取的技术称为双水相萃取技术,也称为水溶液两相分配技术。双水相萃取技术已广泛应用于生物化学、细胞生物学、生物化工和食品化工等领域,并取得了许多成功的范例,具有广阔的工业应用前景^[1]。

1 双水相萃取技术在生物工程下游过程的应用

1955年,瑞典Lund大学学者Albertson首次利用双水相技术来分离生物分子,他将双水相分配技术

应用于色谱法从单细胞藻类中分离淀粉核,此后他和他的同事们做了大量有关双水相萃取技术的工作,主要研究了聚乙二醇(PEG)/葡聚糖双水相系统和PEG/无机盐系统在生物分离纯化中的应用。20世纪70年代中期,前联邦德国的Kula和Kroner等率先将双水相体系应用于从细胞匀浆液中提取酶和蛋白质,大大地改善了胞内酶的提取效果。自20世纪80年代初期起,双水相萃取技术开始应用于工业生产。

目前,双水相萃取技术已实现了细胞器、细胞膜、病毒等多种生物体和生物组织以及蛋白质、酶、核酸、多糖、生长素等大分子生物物质的分离与纯化,取得了较好的成效。近年来,双水相萃取技术的分离对象进一步扩大,已包括了抗生素、多肽和氨基

收稿日期:2004-02-18;修回日期:2004-04-06

基金项目:广东省自然科学基金(000453);华南理工大学高水平大学建设重大项目资助项目

作者简介:胡松青(1972-),男,博士,讲师,主要从事分离与纯化的理论和技术以及功率超声在生物化工和食品化工中应用的研究,020-87112214, fesqhu@scut.edu.cn。

酸、重金属离子和植物有效成分^[2]中的小分子物质。表1为近年来双水相萃取技术在生物物质分离的部分应用实例。总之,双水相萃取技术在生物工程下游技术中已经显示了良好的应用前景。

表1 双水相萃取技术在生物分离中的应用

分离物质	实例	体系
蛋白质	从奶酪中分离 β 乳球蛋白 ^[3]	PEG/磷酸盐
	从转基因羊乳中纯化药物蛋白 ^[4]	PEG/硫酸铵
酶	从细胞培养液中提取脂肪酶 ^[5]	PEG/磷酸盐
	从发酵液中分离提取 α -淀粉酶和蛋白酶 ^[6]	PEG/硫酸铵
	从发酵液中提取葡萄糖苷酶 ^[7]	PEG/硫酸铵
核酸	RNA的分离 ^[8]	PEG/葡聚糖
抗生素	从全发酵液萃取丙酰螺旋霉素 ^[9]	PEG/磷酸盐
	从发酵液中提取青霉素 ^[10]	PEG/硫酸铵
多糖	牛膝高分子物质中多糖成分的纯化 ^[11]	PEG/磷酸盐
	微生物牛乳糖的纯化 ^[12]	PEG/磷酸盐
	线性和环状低聚糖的分离 ^[13]	PEG/磷酸盐
植物有效成分	从黄芩中提取黄芩甙和黄芩素 ^[14-15]	PEG/磷酸盐 EOPO/水
色素	从大肠杆菌中提取细胞色素b5 ^[16]	PEG/硫酸铵
抗体	从禽卵黄中提取IgG抗体 ^[17]	PEG/磷酸盐

注:EOPO是指环氧乙烷(EO)和环氧丙烷(PO)的随机共聚物。

2 双水相萃取技术的发展趋势

2.1 新型双水相系统的开发

在生物物质分离过程中得到应用的双水相系统有2类:非离子型聚合物/非离子型聚合物/水系统和非离子型聚合物/无机盐/水系统,因为这2类系统所用的聚合物无毒性,已被许多国家的药典所收录,而且其多元醇、多元糖结构能使生物大分子稳定。在实际应用中这2类双水相系统各有优缺点,前者体系对生物活性物质变性作用低,界面吸附少,但是所用的聚合物(如葡聚糖)价格较高,成本高,而且体系黏度大,影响工业规模应用的进展;后者成本相对低,黏度小,但是由于高浓度的盐废水不能直接排入生物氧化池,使其可行性受到环保限制,且有些对盐敏感的生物物质会在这类体系中失活。因此,寻求新型双水相体系成为双水相萃取技术的主要发展方向之一,新型双水相体系的开发主要有2类:廉价的双水相系统及新型功能双水相系统。

廉价双水相系统的开发目前主要集中在寻找一些廉价的高聚物取代现用昂贵的高聚物,如采用变

性淀粉、麦芽糊精、阿拉伯树胶等取代葡聚糖,羟基纤维素取代PEG,都获得一定成功^[18]。

新型功能双水相体系是指高聚物易于回收或操作简便的双水相体系。Alred采用乙烯基氧与丙烯基氧的共聚物(商品名UCON)和PEG可形成温敏性双水相体系。常温条件下,PEG、UCON和水混合后为均相体系,当加热到40℃时,形成两相体系,上相为PEG和UCON,下相为水,这种体系可以实现PEG和UCON的循环利用^[19]。

近年来又研究开发了一种以热分离聚合物和水组成的新型双水相体系,热分离聚合物的水溶液在高于某一临界温度时分离成两相,该温度点被称为浑浊点。大多数水溶性热分离聚合物是环氧乙烷(EO)和环氧丙烷(PO)的随机共聚物(简称EOPO聚合物)。水-EOPO热分离两相体系由几乎纯水的上相和富含聚合物的下相组成^[20]。Kula等开发了一种表面活性剂Triton和水形成的热分离双水相体系,当温度高于体系浑浊点时,表面活性剂和水形成双水相,上相为表面活性剂相,下相为水^[18]。表面疏水性强的蛋白质易于分配在表面活性剂相中,而菌体和亲水性蛋白质主要分配在水相中,利用这种表面活性剂双水相体系纯化胆固醇氧化酶,酶收率高达90%。

由正离子表面活性剂(如十二烷基硫酸钠)和负离子表面活性剂(如十六烷基三甲基溴化铵)组成的混合水溶液在一定条件下会形成双水相,平衡的两相均为很稀的溶液。正、负离子混合表面活性剂双水相系统的发现为生物活性物质分离提供了一种新的双水相系统。与高分子双水相系统和非离子型表面活性剂双水相系统相比,它具有含水量高(质量分数可达99%)、两相容易分离、表面活性剂的用量很小且可循环使用等独特优点^[21]。目前,应用这类双水相系统进行物质分配已开展了一些研究工作,国内已有利用该类型双水相系统分离蛋白质、酶、氨基酸和卟啉等的报道,对于双水相的一些物理化学性质也进行了一定的研究,但对不同正、负离子表面活性剂混合形成双水相系统的规律、双水相区域及其影响因素等的研究相对较少。

2.2 亲和双水相萃取技术

亲和双水相萃取技术是在组成相系统的聚合物(如PEG、葡聚糖等)上耦联一定的亲和配基。根据配基性质不同,常用于亲和双水相系统的配基有3种:基团亲和配基型、染料亲和配基型和生物亲和配基型。近几年来双水相亲和分配组合技术发展极为

迅速,仅在 PEG 上接上亲和配基就达 10 多种,分离纯化的物质已有几十种。Kamihira 等将亲和配基 IgG 耦联在聚合物 EudragitS100 上,它主要分布在双水相系统的上相,应用该亲和双水相系统提纯重组蛋白质 A,重组蛋白质的纯度提高了 26 倍,达到 81%,收率为 80%^[22]。

针对抗体、凝集素等双水相萃取亲和配基不能在高盐浓度下操作、不能用于成本较低的 PEG/无机盐系统的缺点,有人提出了以金属螯合物为亲和配基的金属配基亲和双水相系统。与其他亲和双水相萃取技术相比,金属配基亲和双水相具有亲和配基价廉、可用于低成本的 PEG/无机盐体系以及亲和配基再生容易等特点。金属亲和双水相萃取利用金属离子和蛋白质表面的精氨酸、组氨酸、半胱氨酸的亲和作用,达到分离和纯化蛋白质目的。

Birkenmeier 等发现在蛋白质的金属亲和双水相萃取中最有效的是 Cu^{2+} 。目前,金属离子亲和双水相萃取已应用于多种酶的分离纯化:Wuenschell 等采用含有 Cu^{2+} -IDA(亚氨基醋酸)-PEG 的双水相系统萃取了亚铁血红素蛋白;Arnold 和她的合作者用含有 Cu^{2+} -IDA-PEG 的双水相系统萃取了血红素,用含有 Fe^{3+} -IDA-PEG 的双水相系统萃取了含磷蛋白质^[23]。谭天伟等研究了 Cu^{2+} -IDA-PEG20000 的合成方法及超氧化歧化酶(SOD)在含有 Cu^{2+} -IDA-PEG20000 的 PEG4000/ Na_2SO_4 双水相体系中分配系数模型^[24];Guinn 研究了血红蛋白等在单级金属亲和双水相系统的分离纯化特性,并探讨了采用多级逆流萃取操作的可行性^[23]。

2.3 双水相萃取技术与相关技术的集成

双水相分配技术作为一个很有发展前景的生物分离单元操作,除了其独特优势外,也有一些不足之处,如易乳化、相分离时间较长、成相聚合物的成本较高、单次分离效率不高等,一定程度上限制了双水相分配技术的工业化推广和应用。如何克服这些困难,已成为国内外学者关注的焦点,其中“集成化”概念的引入给双水相分配技术注入了新的生命力。

双水相分配技术与其他相关的生物分离技术进行有效组合,实现了不同技术间的相互渗透、相互融合,充分体现了集成化的优势。有人认为双水相萃取与相关技术的集成可以归纳成为以下 3 个方面:①与温度诱导相分离、磁场作用、超声波作用、气溶胶技术等常规技术实现集成化,改善了双水相分配技术中诸如成相聚合物回收困难、相分离时间较长、易乳化等问题,为双水相分配技术的进一步成熟、完

善并走向工业化奠定了基础;②与亲和沉淀、高效层析等新型生化分离技术实现过程集成,充分融合了双方的优势,既提高了分离效率,又简化了分离流程;③将生物转化、化学渗透释放和电泳等技术引入双水相分配,给已有的技术赋予了新的内涵,为新分离过程的诞生提供了新的思路^[25]。

2.4 双水相萃取过程的开发

采用常规的搅拌设备或静态混合器进行双水相萃取操作,由于这类体系的界面张力低,极易分散成细小液滴,溶质在系统两相间的传质速率快,可以迅速达到平衡。但是,经混合的物系相分离时间长。为了消除操作过程中双水相萃取技术的缺点,近年来,有人分别用聚丙烯中空纤维束按膜萃取的方法或利用喷雾塔的方式来进行双水相萃取。前者采用 PEG/无机盐系统,后者采用 PEG/葡聚糖系统,分别对多种酶和牛血清清蛋白的传质速率进行了测定,所得传质系数都在传统溶剂萃取过程分离小分子溶质的数值范围内^[26]。国内浙江大学研究了填料塔中牛血清清蛋白和青霉素 G 钠盐在 PEG/硫酸铵双水相系统中的传质特性,用修正的 Handlols-Baron 对传质系数进行关联得到了较好的结果^[27]。虽然,这只是实验室小装置内的研究结果,但对双水相萃取过程的设备选型和设计,具有一定的参考价值。

初期的双水相萃取过程仍以间歇操作为主。近年来,在天冬酶、乳酸脱氢酶、富马酸酶与青霉素酰化酶等多种产品的双水相萃取过程中均已采用了连续操作,有的还实现了计算机控制^[28],这不仅对提高生产能力,实现全过程连续操作和自动控制,保证得到高活性和质量均一的产品具有重要意义,而且也标志着双水相萃取技术在工业生产中的应用日趋成熟和完善。

2.5 双水相萃取相关理论的发展

虽然双水相萃取技术在应用方面取得了很大进展,但目前这些工作几乎都只是建立在实验数据的基础上,至今还没有一套比较完善的理论来解释生物大分子在体系中的分配机理。考虑到生物物质在双水相系统中分配时是一个由聚合物、聚合物(或无机盐)、生物分子和水等构成的四元系统,系统中的组分性质千差万别,从晶体到无定形聚合物、从非极性到极性、从电解质到非电解质、从无机小分子到有机高分子甚至生物大分子,这些都不可避免地造成理论计算的复杂性。因此,建立溶质在双水相系统中分配的机理模型一直是双水相系统相关研究的重点和难点。

有关溶质在双水相系统中分配模型的前期研究中,比较成功的主要有2类模型,Edmond等提出的渗透维里模型,以及Flory和Huggins根据热力学基本原理提出的Flory-Huggins晶格模型。前者在预测聚合物的成相行为和蛋白质的分配上有较高的准确度,后者在粒子的能量概念上可以很好地拟合实验数据。自20世纪80年代中期以来,各国学者开展了进一步的研究工作,各类用于计算生物物质在双水相系统分配系数的模型也时有报道,诸如Baskir晶体吸附模型、Hayne模型、Pitzer模型、Grossman自由体积模型等,但结果均难以令人满意^[29]。1989年,Diamond和Hsu以Flory-Huggins理论为基础,推导出生物分子在有关双水相体系中的分配模型。Diamond-Hsu模型既可计算聚合物/聚合物双水相系统中低分子质量肽的分配系统,又能计算高分子质量蛋白质的分配系数,有一定的普适性。此后,针对该模型在计算蛋白质在聚合物/盐双水相系统中的分配系数时精确度不高的缺点,Diamond等和梅乐和等^[30]相继提出了改进的Diamond-Hsu模型,进一步提高了Diamond-Hsu模型的精确度和普适性。

参考文献

- [1] Huddleston J. [J]. Trends in Biotechnology, 1995, 136(7): 311.
- [2] 黎海斌, 李琳, 郭祀远. [J]. 现代化工, 2002, 22(5): 59 - 62.
- [3] Coimbra J S R, Thoenmes J, Kula M R, et al. [J]. Arq Biol Tecnol, 1997, 40(1): 189 - 196.
- [4] Harris D P, Andrews A T, Wright G, et al. [J]. Bioseparation, 1997, 7(1): 31 - 37.
- [5] Bradoo S, Saxena R K, Gupta R. [J]. Process Biochemistry, 1999, 35(1-2): 57 - 62.
- [6] 焦庆才, 刘茜, 陈耀祖. [J]. 高等学校化学学报, 1998, 19(3): 391 - 394.
- [7] Sinha J, Dey P K, Panda T. [J]. Biochemical Engineering Journal, 2000, 6(3): 163 - 175.
- [8] Kimura K, Kobayashi H. [J]. J Chromatogr B, 1996, 680(1-2): 213 - 219.
- [9] 秦德华, 潘杰, 高红. [J]. 中国抗生素杂志, 1998, 23(2): 144 - 147.
- [10] 关怡新, 傅晖, 朱自强. [J]. 浙江大学学报(自然科学版), 1997, 31(4): 498 - 504.
- [11] 巢志茂, 庸一, 神腾平三郎. [J]. 中国药理学杂志, 1999, 34(7): 444 - 446.
- [12] Chang W J, Koo Y M. [J]. Biotechnol Tech, 1998, 12(6): 455 - 457.
- [13] Kang E C, Akiyoshi K, Sunamoto J. [J]. J Bioact Compat Polym, 1999, 14(1): 6 - 16.
- [14] Mishima K, Totoki M, Nomiyama T, et al. [J]. Solv Extr Res Japan, 1996, 3(3): 288 - 243.
- [15] 李伟, 朱自强, 梅乐和. [J]. 化工学报, 1998, 49(1): 92 - 96.
- [16] Porto A L F, Lima-Filho J L, Aires-Barros M R, et al. [J]. Biotechnol Tech, 1997, 11(9): 641 - 643.
- [17] 侯卫东, 杨国宁. [J]. 畜牧兽医学报, 1998, 17(1): 7, 19.
- [18] 谭天伟, 沈忠耀. [J]. 微生物学通报, 1996, 23(6): 368 - 370, 36.
- [19] Alred P A, Tjerneld F, Kozlowski A, et al. [J]. Bioseparation, 1992, 2(6): 363 - 373.
- [20] Johansson H O, Karlstrom G, Tjerneld F. [J]. Macromolecules, 1993, 26(17): 4478 - 4483.
- [21] Tong A, Wu Y, Tan S, et al. [J]. Anal Chim Acta, 1998, 369(1-2): 11 - 16.
- [22] Kamihira M, Kaul R, Mattiasson B. [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1992, 40(11): 1381 - 1387.
- [23] Guin M R. Isolation and purification of protein by single-stage metal affinity partitioning in aqueous two-phase systems and by multi-stage counter-current distribution [D]. Colorado: University of Colorado, 1996.
- [24] 谭天伟, 王丙武, 刘德华. [J]. 化工学报, 1996, 46(5): 621 - 626.
- [25] 林东强, 朱自强, 姚善泾, 等. [J]. 化工学报, 2000, 51(1): 1 - 6.
- [26] 邓修, 吴俊生. 化工分离工程[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [27] 梅乐和, 朱自强, 林东强. [J]. 化学工程, 1999, 27(2): 23 - 27.
- [28] Mistry S I, Kaul A, Merchuk J C, et al. [J]. J Chromatogr A, 1996, 741(2): 151 - 163.
- [29] Sargantanis I G, Karim M N. [J]. I & E C Research, 1997, 36(1): 204 - 211.
- [30] 梅乐和, 朱自强, 林东强, 等. [J]. 浙江大学学报(自然科学版), 1999, 33(1): 52 - 56. ■
- [28] Mikos A G, Peppas N A. [J]. J Controlled Release, 1990, 12(1): 31 - 37.
- [29] Roberts W K, Häfeli U O. [J]. Applied Radiation and Isotopes, 1999, 51(5): 543 - 549.
- [30] Häfeli U O, Roberts W K, Pauer G J, et al. [J]. Applied Radiation and Isotopes, 2001, 54(6): 869 - 879.
- [31] McNeil R G, Ritter R C, Wang B, et al. [J]. IEEE Trans on Biomed Eng, 1995, 42(8): 802 - 808.
- [32] Häfeli U O, Pauter G J. [J]. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 1999, 194(1-3): 76 - 82. ■

(上接第21页)

- [24] Shinkai M, Suzuki M, Iijima S, et al. [J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 1995, 21(2): 125 - 137.
- [25] Klivanov A L, Maruyama K, Torchilin V P, et al. [J]. FEBS Lett, 1990, 268(1): 235 - 237.
- [26] Schütt W, Klinkmann H. Cell Electrophoresis[M]. New York/Berlin: Walter de Gruyter, 1985. 125 - 155.
- [27] Marlow B, Fairhurst D, Schütt W. [J]. Langmuir, 1988, 4(3): 776 - 780.