

辛巴蓝 F3GA-羟丙基淀粉的制备及其对蛋白质的亲和分离特性

李晓玺, 邹芹, 江咏, 陈玲, 李琳

(华南理工大学淀粉与植物蛋白深加工教育部工程研究中心, 广东省天然产物绿色加工与产品安全重点实验室, 广东广州 510640)

摘要: 为了开发新型的淀粉基生物分离材料, 制备了适用于亲和双水相萃取技术的辛巴蓝 F3GA-羟丙基淀粉, 并考察了其对蛋白质的亲和分离特性。将三嗪类染料辛巴蓝 F3GA 分别偶联于不同取代度的羟丙基淀粉上, 对其反应时间、温度以及 pH 进行考察, 根据亲和配基密度, 得到制备亲和分离材料的优化工艺条件为: 反应温度 60 °C, 反应时间 6 h, pH 9.5。进一步考察了亲水性基团、亲和配基对羟丙基淀粉亲和材料/聚乙二醇双水相体系液液平衡的影响, 表明, 亲和配基的引入对系统的相平衡影响很小, 系统结线都基本重合, 斜率变化很小; 随着羟丙基淀粉取代度的增大, 双水相呈相区域向右移。牛血清白蛋白被分配到羟丙基淀粉亲和材料相中, 当亲和配基密度达到 1.25 μmol/g 时, 分配效率从 30% 提高到 80% 以上。

关键词: 羟丙基淀粉; 聚乙二醇; 亲和双水相系统; 牛血清白蛋白; 亲和分离

文章编号: 1673-9078(2013)1-91-95

Synthesis of Cibacorn Blue F3GA-hydroxypropyl Starch and its Application in Affinity Separation of Protein

LI Xiao-xi, ZOU Qin, JIANG Yong, LI Lin, CHEN Ling

(Ministry of Education Engineering Research Center of Starch & Protein Processing, Guangdong Province Key Laboratory for Green Processing of Natural Products and Product Safety, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In order to develop a novel starch based biological separation material, the F3GA-hydroxypropyl starch for the aqueous two-phase extraction system was prepared and its affinity separation characteristics for protein were investigated. Triazine dyes were respectively coupled with hydroxypropyl starch with different degrees of substitution. The effects of affinity ligand density, reaction time, temperature and pH on the degrees of substitution were observed and the optimal conditions of the preparation of affinity separation material were obtained. The affinity separation material was prepared at 60 °C for 6 hours at the pH value of 9.5. Furthermore, the effects of the hydrophilic group and affinity ligand on liquid-liquid equilibrium of hydroxypropyl starch affinity material/PEG aqueous two-phase system were studied. The results indicated that the effect of affinity ligand on phase equilibrium of system was slight and the slope change of the basically overlapping tie lines was also small and the area of aqueous two-phase was right-shift with increasing the degree of substitution of hydroxypropyl starch. Additionally, the distribution and affinity efficiency of bovine serum albumin (BSA) in this aqueous two-phase system were also observed. Most of the BSA was distributed to the phase of hydroxypropyl starch affinity materials, as well as the affinity efficiency was improved from 30% to more than 80% with the affinity ligand density of 1.25 μmol/g.

Key words: hydroxypropyl starch; polyethylene glycol; affinity aqueous two-phase systems; bovine serum albumin; affinity separation

由于食品功能学、食品酶工程、发酵工程、食品

收稿日期: 2012-08-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21076086); 国家科技支撑计划课题 (2012BAD37B01、2012BAD34B07); 广东省自然科学基金 (S2011010001677)

作者简介: 李晓玺 (1977-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为多糖结构修饰与功能材料

通讯作者: 李琳 (1962-), 男, 教授, 博导

基因工程等的进步, 使得各类天然来源或者生物制造的功能性蛋白质和肽类、多糖和寡糖、脂质和脂肪酸等重要生理活性物质正以空前的速度和品种数量进入新型食品配料、添加剂的行列。为了获得各种不同功能应用的食物生物活性物质, 对其生物分离纯化技术也提出了越来越高的要求。生物分离纯化技术的核心是设计和制备适用范围广泛的分离材料, 由此而引起

的研制和开发适合的新型分离材料,从而建立新的高效生物分离技术。这对各类食品生物活性物质及以此为基础的功能食品的开发倍显重要。亲和双水相萃取技术利用配基和目标物之间特异性的亲和作用,实现亲和萃取,可大幅度地提高分离过程的选择性,易于保持生物物质活性。因此,研究开发适用于亲和双水相萃取技术的分离材料具有重要的科学意义和良好的应用前景^[1-7]。

目前,寻找“生态环境友好”和“可再生”且廉价的亲和双水相材料越来越受到人们的关注。已经开展研究的材料有变性淀粉、乙基羟乙基纤维素、羟纤维素、聚乙烯酯等,它们都具有良好的亲水性和亲和性^[1,8-14]。亲和双水相技术作为功能活性物质提取分离的一个重要方法,能从复杂的天然产物中分离得到有效成分,并且有效成分含量和功能能够得到很好的保持,目前溶解酶素、甘草酸等物质的萃取工艺已进行了研究,但是由于该技术处于起步阶段,还应加强系统研究,使亲和双水相萃取能成为一种优良的分离技术,更有利于有效、合理的开发天然资源^[15]。本文通过对淀粉分子结构进行修饰和设计,在其分子链上引入特异性亲和配基,从而提高淀粉分子与目标分子间的分子识别和特异亲和性,获得淀粉基亲和双水相萃取材料。通过考察淀粉基亲和双水相萃取系统对蛋白的亲和分离特性,掌握淀粉基双水相分离材料亲和分离的有效调节方法,为设计出淀粉基亲和双水相萃取材料奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

羟丙基淀粉(采用淀粉与环氧氯丙烷经醚化反应的方法制得^[16],分别得到取代度分别为0.180、0.245、0.333的样品B2、B3、B4);二乙胺基乙基纤维素52(分析纯),国药集团化学试剂有限公司;辛巴蓝F3GA(Cibacorn blue F3GA)(分析纯),BIO BASIC INC公司;PEG10000(分析纯),UNI-CHEM Chemical公司;牛血清白蛋白(BSA)、考马斯亮蓝G250(生化纯),上海伯奥生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

Tensor 37 傅里叶变换红外光谱仪,德国 Bruker 公司;真空冷冻干燥器, Thermo 公司;PCS 紫外分光光度计,上海 Unico 公司;旋转蒸发仪,上海嘉鹏科技有限公司;超速冷冻离心机,德国 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 羟丙基淀粉亲和双水相分离材料的制备及纯化

将一定量的羟丙基淀粉,分散于水中,控制整个

反应体系 pH 保持在 9~10 范围内,在一定温度下加热并不断搅拌,反应一定时间后加入一定比例的辛巴蓝 F3GA 进行反应。反应完成后冷却,调节 pH 至中性。然后加入乙醇沉淀分离精制反应产物。将反应产物溶解在 100 mL 的水中,与二乙胺基乙基纤维素(5 g)以及 2 mol/L KCl 混合进行离子交换 3 h 后,过滤出离子交换的载体,然后用 KCl 0.1 mol/L 的洗涤,收集滤液。透析过夜后经干燥得到纯化的羟丙基淀粉亲和双水相分离材料。其偶联的染料配基取代度采用分光光度法测定反应前后染料差而得^[17]。通过调节反应时间、温度和 pH 值,得到不同亲和配基密度的羟丙基淀粉亲和双水相分离材料。

1.3.2 羟丙基淀粉亲和双水相分离材料的红外分析

采用 KBr 压片法,将待测样品按 1% 的比例与 KBr 充分混合、研磨、压片后置于红外光谱仪中进行测试,扫描波数范围为 4000~400 cm^{-1} ,分辨率为 4 cm^{-1} ,采用 DTGS 检测器,以空气为空白,扫描 64 次后取平均值可得到样品的红外光谱图。

1.3.3 羟丙基淀粉亲和双水相分离材料/PEG 亲和双水相萃取系统的建立

分别配制一定质量浓度的羟丙基淀粉亲和双水相分离材料溶液、PEG10000 溶液,依次加入到具塞离心管中,最终用蒸馏水补至 10 mL,充分混合后制备出不同组成的羟丙基淀粉亲和双水相分离材料与 PEG10000 亲和双水相萃取系统。

1.3.4 羟丙基淀粉亲和双水相分离材料与 PEG 相平衡测定

将配制好的不同羟丙基淀粉亲和双水相分离材料与 PEG10000 形成的亲和双水相萃取混合液 10 mL 经转速 7500 r/min 离心 15 min 后,直至双水相体系完全分层。取出离心管恒温放置 24 h,分别分离出羟丙基淀粉亲和双水相分离材料与 PEG10000 相,并采用苯酚硫酸铜法、冻干法对羟丙基淀粉亲和双水相分离材料与 PEG10000 进行质量分数分析^[18,19]。

1.3.5 BSA 在亲和双水相萃取系统中的分配效率

在羟丙基淀粉亲和双水相分离材料/PEG 亲和双水相萃取系统中加入一定量的 BSA 溶液,充分振荡,混合均匀。静置,直至上下相完全分离。记录上、下相的成相体积(V_t 、 V_b),移取 5 mL 的上、下相溶液,用考马斯亮蓝法测得上、下相 BSA 质量分数(C_t 、 C_b),根据 Brønsted 提出的分配系数 $Y=1/(1+k\varepsilon)$ 和分配系数 $k=C_b/C_t$ 和上下相体积比 $\varepsilon=V_b/V_t$ 计算 BSA 的分配系数^[20-21]。

2 结果与分析

2.1 反应温度、pH 和反应时间对羟丙基淀粉亲和配基取代度的影响

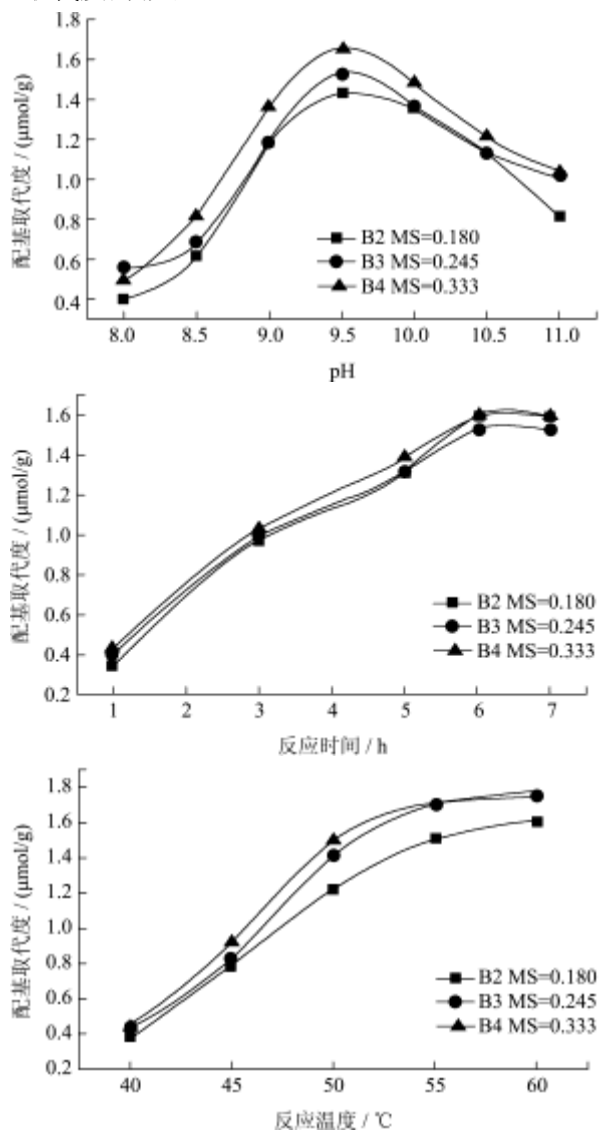


图1 反应 pH、时间和温度对羟丙基淀粉亲和配基取代度的影响
Fig.1 Effect of reaction temperature, pH and time on ligand substitute of hydroxypropyl starch

选择取代度 MS 分别为 0.180、0.245、0.333 的羟丙基淀粉，控制反应体系中羟丙基淀粉与辛巴蓝 F3GA 的比例为 1:1，调节不同的反应温度、pH 和反应时间进行羟丙基淀粉与辛巴蓝 F3GA 的偶联反应，结果如图 1 所示。从图 1 中可以看出，在反应温度 55 $^{\circ}\text{C}$ 、反应时间 5 h 的条件下，考察不同 pH 值对羟丙基淀粉染料偶联率的影响，在碱性条件下，由于羟丙基淀粉的-OH 被活化，羟丙基淀粉偶联的染料配基不断增加，在 pH 为 9.5 时达到最大，然后由于辛巴蓝 F3GA 的水解作用而不断降低；在反应温度 55 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 为 9.5 的条件下，反应时间达到 6 h 后，羟丙基淀粉达到饱和偶联能力，此时偶联配基程度较大，但由于羟丙基淀粉分子量大，在水溶液中分子为无规则线团，

各支叉结构的位阻使其反应较慢。当反应 pH 为 9.5、反应时间为 6 h 的条件下，三种羟丙基淀粉均呈现随着反应温度提高配基取代度增加的趋势，但温度超过 55 $^{\circ}\text{C}$ 后，染料配基密度增加的趋势较平缓，当温度达到 60 $^{\circ}\text{C}$ 时，偶联配基的取代度达到最大；随着淀粉分子中羟丙基取代度的提高，羟丙基淀粉偶联配基的程度越大。这可能是由于羟丙基取代度大的淀粉亲水性更好，在反应溶液中淀粉分子能很好的展开成无规则线团，与辛巴蓝 F3GA 更好的接触而发生反应。

2.2 羟丙基淀粉亲和双水相萃取材料链结构表征

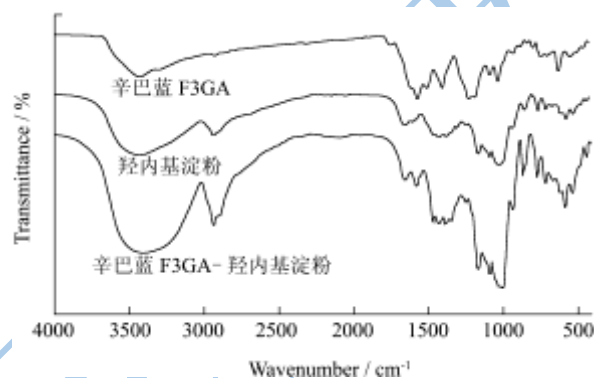


图2 B4、CBD、B4-CBD 的红外光谱图

Fig.2 FTIR spectra of B4、CBD、B4-CBD

由图 2 可以得到，在辛巴蓝 F3GA 的红外光谱图中，3400 cm^{-1} 是伯胺 NH_2 的伸缩振动吸收峰，而羟丙基淀粉在 3400 cm^{-1} 同样具有强而宽的 O-H 伸缩振动吸收峰，因此，不能通过该峰确定配给偶联是否成功。但相对于羟丙基淀粉，偶联后羟丙基淀粉在 1610 cm^{-1} 处出现新峰，对比辛巴蓝 F3GA 红外光谱图谱认为该峰是伯胺 NH_2 的变角振动吸收峰，这表明配基的偶联是成功的。

2.3 羟丙基淀粉亲和双水相萃取系统的建立

通过调节反应时间、温度和 pH 值，综合考虑各种产品偶联辛巴蓝 F3GA 的难易度，分别制备了配基密度为 1.25 $\mu\text{mol/g}$ 的不同取代度羟丙基淀粉亲和材料，并与 PEG 构成双水相系统。图 3 比较了相同亲水基团取代度的羟丙基淀粉偶联配基前后与 PEG 形成的双水相系统的相图。从图中可以看出，随着亲和配基密度的提高，结线的斜率变大，但变化不明显，表明亲和配基的引入对系统的相平衡影响很小。由于整体相图未发生变化，在亲和配基密度相同的情况下，亲和羟丙基淀粉的相图随着羟丙基淀粉取代度的变化规律与未接配基时的羟丙基淀粉相同的。如图 4 所示，随着羟丙基淀粉取代度的升高，双水相呈相区域向右移，这是因为羟丙基淀粉与 PEG 之间的的亲水性程度差距逐渐减小。

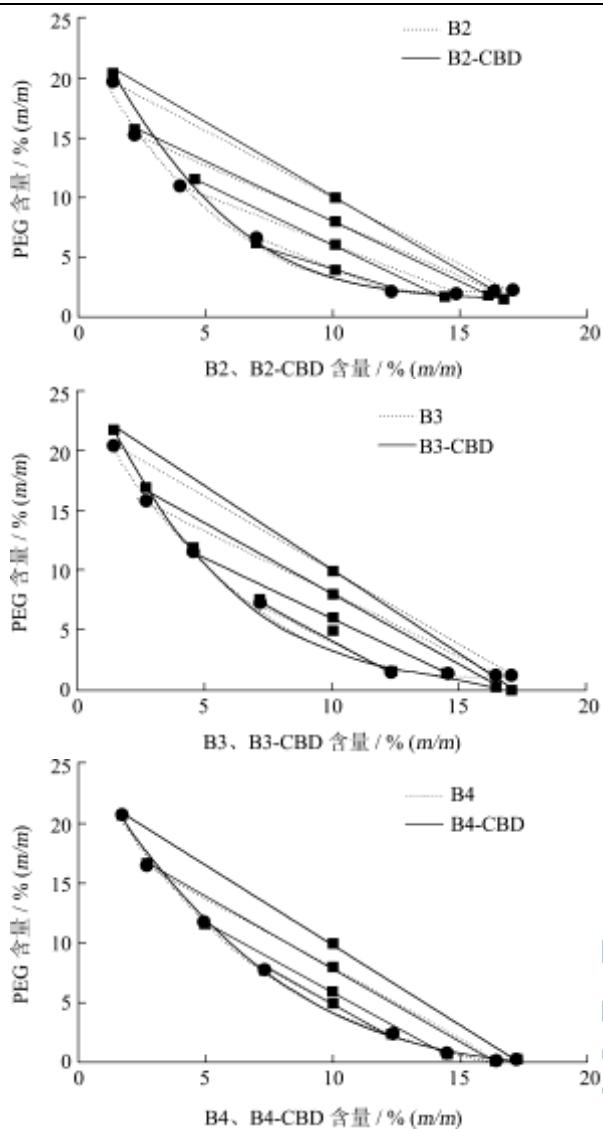


图3 偶联亲和配基前后羟丙基淀粉/PEG 双水相系统相图

Fig.3 The phase diagram of hydroxypropyl starch/PEG before and after coupled with Cibacorn blue F3GA

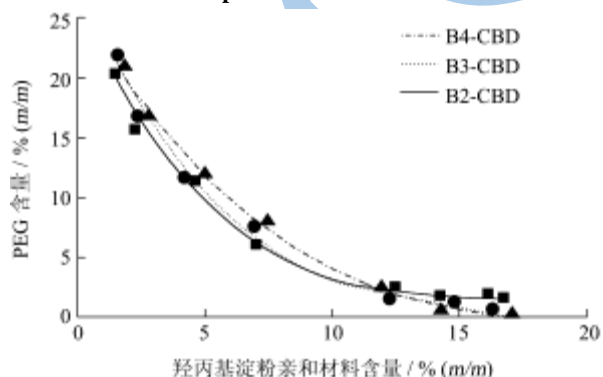


图4 亲和羟丙基淀粉/PEG 亲和双水相系统双节点曲线比较

Fig.4 Comparison of binodals for Cibacorn blue F3GA-hydroxypropyl starch/PEG affinity aqueous two-phase systems

2.4 BSA 在羟丙基淀粉/PEG 双水相系统中的分配
根据 2.3 中的方法, 按一定比例将偶联辛巴蓝

F3GA 配基前后的羟丙基淀粉与 PEG 混合, 取 BSA 溶液加入其中充分混合, 经离心分层后, 测定 BSA 分别在两相中的比例。

表 1 BSA 在双水相萃取系统中的分配

Table 1 The partition behavior of BSA in affinity aqueous two-phase systems

相材料	相比 ϵ	分配效率 Y/%	K
B2 MS=0.180	0.80±0.12	32.21±1.23	2.65±0.23
B3 MS=0.245	0.84±0.08	32.90±0.56	2.41±0.41
B4 MS=0.333	0.90±0.10	30.31±0.63	2.59±0.12

表 2 BSA 在亲和双水相萃取系统中的分配

Table 2 The partition behavior of BSA in affinity affinity aqueous two-phase systems

相材料	相比 ϵ	分配效率 Y/%	K
B2-CBD	0.80±0.14	85.61±0.76	0.21±0.10
B3-CBD	0.84±0.15	84.40±1.01	0.22±0.07
B4-CBD	0.90±0.10	83.65±0.82	0.22±0.09

由表 1、2 对比可知, 在没有引入亲和配基的双水相系统中, BSA 在羟丙基淀粉相中的分配效率都小于 50%, 这是因为 PEG 的亲水性较强, 使蛋白质在 PEG 相的表面张力减小, 从而易于向 PEG 相中分配。随着羟丙基淀粉羟丙基取代度的提高, 其在羟丙基淀粉中的分配效率下降, 这是由于羟丙基基团的增多, 淀粉分子与 PEG 分子之间的相容性提高, 从而使得双水相成相能力降低的缘故 (图 4)。当在羟丙基淀粉分子中引入辛巴蓝 F3GA 配基后, BSA 在所构建的双水相系统中的分配行为发生了改变, 其在亲和羟丙基淀粉相中的分配效率增大。当亲和配基密度为 1.25 $\mu\text{mol/g}$ 时, 在羟丙基淀粉亲和材料构建的亲和双水相系统中, BSA 的分配系数由 2.41~2.65 变化到 0.21~0.22, 分配效率可达 80% 以上。说明亲和作用使得蛋白质趋向于下相分配, 且在影响分配行为的各个因素中起主导地位。

3 结论

3.1 实验结果表明, 在羟丙基淀粉与辛巴蓝 F3GA 的比例一定的条件下, 控制反应体系中不同的反应温度、pH 和反应时间可以调节辛巴蓝 F3GA 的偶联程度, 辛巴蓝 F3GA 配基取代度最大的羟丙基淀粉亲和分离材料的反应条件为: 温度 60 $^{\circ}\text{C}$, 时间为 6 h, pH 值为 9.5。随着淀粉分子中羟丙基取代度的提高, 羟丙基淀粉偶联配基的程度越大。

3.2 红外光谱证实了辛巴蓝 F3GA 配基的成功偶联。偶联亲和配基之后, 羟丙基淀粉与 PEG 构建的双水相系统的相平衡变化较小, 系线都基本重合, 此外, 在

亲和配基密度相同的情况下,淀粉的相图随着羟丙基取代度的变化规律与未接配基时的相同。

3.3 在引入亲和配基后,BSA在PEG相的分配效率提高了3倍左右,说明本实验成功的调节了BSA在辛巴蓝F3GA-羟丙基淀粉相和PEG相中的分配系数,使得偶联了亲和配基的淀粉基材料富集相中BSA的分配效率都在80%以上。

参考文献

- [1] 江咏,李晓玺,李琳,等.双水相萃取技术的研究进展及应用[J].食品工业科技,2007,28(10):235-238
- [2] 郑楠,刘杰.双水相萃取技术分离纯化蛋白质的研究[J].化学与生物工程,2006,23(10):7-9
- [3] 严希康,俞俊棠.生化分离工程[M].北京:化学工业出版社,2001
- [4] Teotia S, Lata R, Gupta M N. Chitosan as a macroaffinity ligand: Purification of chitinases by affinity precipitation and aqueous two-phase extractions [J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1052(1-2): 85-91
- [5] Fernandes S, Kim H S, Hatti-Kaul R. Affinity Extraction of Dye- and Metal Ion-Binding Proteins in Polyvinylpyrrolidone-Based Aqueous Two-Phase System [J]. Protein Expression and Purification, 2002, 24(3): 460-469
- [6] 胡松青,李琳,郭祀远,等.双水相萃取技术研究新进展[J].现代化工,2004,24(6):22-25
- [7] 谭志坚,李芬芳,邢健敏.双水相萃取技术在分离、纯化中的应用[J].化工技术与开发,2010,39(8):29-35
- [8] Long M S, Keating C D. Nanoparticle Conjugation Increases Protein Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems [J]. Analytical Chemistry, 2006, 78(2): 379-386
- [9] Estela da S. M, Teixeira F T. Purification of soybean peroxidase (*Glycine max*) by metal affinity partitioning in aqueous two-phase systems [J]. Journal of Chromatography B, 2000, 743(1-2): 287-294
- [10] Antov M, Anderson L, Anderson A, et al. Affinity partitioning of a *Cellulomonas fimi* β -mannanase with a mannan-binding module in galactomannan/ starch aqueous two-phase system [J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1123(1): 53-59
- [11] 谭平华,林金清,肖春妹,等.双水相萃取技术研究进展及应用[J].化工生产与技术,2003,10(1):19-23
- [12] Waziri SM, Abu-Sharkh B F, Ali S A. Protein Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems Composed of a pH-Responsive Copolymer and Poly (ethylene glycol) [J]. Biotechnology Progress., 2004, 20(2): 526-532
- [13] 江咏,李晓玺,李琳,等.多糖类亲和分离材料的研究进展[J].现代化工,2006,26(8):19-23
- [14] 马春宏,朱红,王良,等.双水相萃取技术的应用研究进展[J].光谱实验室,2010,27(5):1906-1914
- [15] 单海峰.天然产物的提取、分离纯化及活性研究[D].浙江:浙江工业大学,2010
- [16] 温其标,陈玲.高取代度羟丙基木薯淀粉制备条件的研究[J].食品工业科技,1997,1:30-33
- [17] 江咏.淀粉基亲和双水相萃取材料及其对蛋白分配行为的影响[D].华南理工大学硕士学位论文,2008
- [18] 张惟杰.糖复合物生化研究技术[M].第二版.浙江:浙江大学出版社,2003
- [19] 胡松青.双水相系统的超声波处理及其相分离速度的模拟[D].华南理工大学博士学位论文,2003
- [20] Grossmann C, Zhu J, Maurer G. Phase equilibrium studies on aqueous two-phase systems containing amino acids and peptides [J]. Fluid Phase Equilibria, 1993, 82: 275-282