

## Ekstrakcja białek przy użyciu odwróconych miceli

Martyna Matla<sup>1</sup>, Anna Smętek<sup>1\*</sup>, Rita Pyc<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instytut Podstaw Chemii Żywności, Politechnika Łódzka

<sup>2</sup> Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka

\*smetek.anna@gmail.com

**Streszczenie:** *Odwrócone micelle, czyli mikroemulsje typu woda w oleju są trójskładnikowymi systemami, które składają się z wody, cząsteczek surfaktantu i rozpuszczalnika organicznego. Mogą one być wykorzystywane do ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz celem oczyszczania i wydobywania białek i innych cząsteczek. Odwrócone micelle są atrakcyjnymi narzędziami w biotechnologii, ponieważ ekstrakcja w tych systemach jest tania, wydajna i łatwo jest w niej powiększać skalę. Wydajność ekstrakcji białek i ich rozpuszczanie w odwróconych micelach zależy od wielu czynników, takich jak pH, siła jonowa czy rodzaj i stężenie surfaktantu. W poniższym artykule przedstawiono proces ekstrakcji białek w odwróconych micelach i ich potencjalne zastosowania. Określono także i omówiono czynniki, które wywierają wpływ na ekstrakcję w układzie ciecz-ciecz.*

**Słowa kluczowe:** *odwrócone micelle, mikroemulsje, ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz.*

### Mikroemulsje

Mikroemulsje są to układy złożone z wody, fazy organicznej i związku amfifilowego, czyli surfaktantu. Są to roztwory optycznie przezroczyste (izotropowe) i stabilne termodynamicznie. Makroskopowo mikroemulsje wyglądają jak jednorodne mieszaniny, lecz w skali molekularnej są one heterogeniczne. Wewnętrzna struktura mikroemulsji w danej temperaturze jest determinowana przez stosunek ilościowy jej składników [1,2].

Przy dużym stężeniu wody wewnętrzna struktura mikroemulsji składa się z niewielkich kropelek rozpuszczalnika organicznego zawieszonych w ciągłej fazie wodnej – są to micelle (zwane także mikroemulsjami o/w). Wraz ze wzrostem stężenia rozpuszczalnika organicznego tworzy się dwuskładnikowa faza ciągła, której kształt nie jest jasno zdefiniowany. Przy wysokim stężeniu fazy organicznej dwuskładnikowa faza ciągła jest przekształcana w strukturę niewielkich kropelek wody w ciągłej fazie organicznej – są to odwrócone micelle, znane także jako mikroemulsje w/o [1,3].

Winsor wyróżnił cztery podstawowe typy mikroemulsji w zależności od składu, są to [4]:

- Winsor I – odpowiada mikroemulsji o/w w fazie olejowej,
- Winsor II – odpowiada mikroemulsji w/o w fazie wodnej,

- Winsor III – surfaktant skoncentrowany jest w fazie środkowej pomiędzy fazą wodną i olejową,
- Winsor IV – gdzie w pojedynczej fazie woda, związek organiczny oraz surfaktant są zmieszane w sposób homogeniczny.

### **Odwrócone micelle**

Struktura odwróconej miceli składa się z wodnej mikrodomeny otoczonej polarnymi głowami surfaktantu, oddziałującej z warstwą niepolarnego rozpuszczalnika organicznego poprzez łańcuch hydrofobowy (liniowy lub rozgałęziony). Polarne rdzenie miceli mają zdolność rozpuszczania znaczącej ilości wody, co wpływa na właściwości układu odwróconej miceli [5].

Asocjacja cząsteczek, zwana procesem micelizacji ma miejsce, gdy ilość surfaktantu w roztworze przekroczy wartość stężenia zwanego krytycznym stężeniem micelizacji (CMC, ang. Critical Micellar Concentration). W zależności od rodzaju rozpuszczalnika mogą się utworzyć micelle lub micelle odwrócone [6]. Przy stężeniach surfaktantu bliskich wartości CMC tworzą się micelle małe i kuliste. Wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu stają się one większe, a po przekroczeniu pewnego stężenia wydłużają się i przyjmują kształty cylindryczne [7].

W rdzeniu wodnym odwróconej miceli zidentyfikowano dwa rodzaje wody: wodę unieruchomioną, która zlokalizowana jest w pobliżu polarnych grup surfaktantu oraz wodę wolną o właściwościach „normalnej” wody. Cząsteczki wody, które umiejscowione są w bliskim sąsiedztwie granicy faz służą do hydratacji polarnych grup surfaktantu [2,8]. Wewnątrz odwróconej miceli mogą być rozpuszczane różne substancje od małych molekuł po duże białka czy też inne cząsteczki, jak np. kwasy nukleinowe, które różnią się rozmiarem i właściwościami [9].

Odwrócone micelle charakteryzuje się poprzez określenie ich średnicy i liczby powstałych agregatów (liczba agregacji). Średnica odwróconej miceli, która zwykle zawiera się w przedziale pomiędzy 20 a 100 Å, jest charakteryzowana przez stosunek molowy wody do surfaktantu ( $w_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{surfaktant}]$ ), który wynosi od 0 do 45 [2,10]. Rozmiar i kształt odwróconej miceli zależy znacząco od rodzaju i stężenia surfaktantu oraz użytego rozpuszczalnika, a także od temperatury, ciśnienia i siły jonowej [2]. Siły, które stabilizują strukturę odwróconej miceli to: oddziaływania hydrofobowe, siły van der Waalsa, oddziaływania elektrostatyczne i wodorowe, w układzie tym nie występują wiązania kowalencyjne [5].

### **Surfaktanty**

Surfaktantami nazywa się substancje powierzchniowo-czynne, które wykazują właściwości amfifilowe, czyli równoczesną niepełną rozpuszczalność w dwóch różnych rozpuszczalnikach. Mają one na jednym końcu łańcucha grupy rozpuszczalne w jednym typie rozpuszczalnika, natomiast na drugim końcu grupy rozpuszczalne w innym typie rozpuszczalnika. Większość związków amfifilowych ma końcowe grupy polarne (hydrofilowe, liofilowe) i apolarne

(hydrofobowe, liofobowe). Dzięki tej właściwości cząsteczki takie tworzą różne typy struktur w różnych rozpuszczalnikach. Surfaktanty gromadzą się na granicach faz, tworząc monowarstwy i obniżają znacznie napięcie międzyfazowe [3,5,6,11,12].

Surfaktant odgrywa ważną rolę w procesie transferu białek w systemach odwróconych miceli, ponieważ stabilizuje rozpuszczone białka, jego polarne grupy główne są skierowane do wnętrza miceli, podczas gdy hydrofobowe ogony rozciągają się do otaczającej warstwy organicznej [3,6].

Kiedy surfaktant jest rozpuszczony w środowisku wodnym, liofobowa (hydrofobowa) grupa zakłóca strukturę wody poprzez rozrywanie mostków wodorowych pomiędzy cząsteczkami wody i umieszczanie wody w sąsiedztwie grup hydrofobowych. W wyniku tego zakłócenia, niektóre z cząsteczek surfaktantu przemieszczają się do powierzchni rozdziału faz systemu, ich fragmenty hydrofobowe minimalizują kontakt z cząsteczkami wody, tworząc na jej powierzchni monowarstwę [13].

Hydrofobowy fragment cząsteczek surfaktantów stosowanych do wytworzenia odwróconych miceli stanowią zwykle łańcuchy węglowodorowe, rzadziej fluorowcowane węglowodorowe lub siloksanowe. Hydrofilowy fragment stanowi jonowa lub silnie polarna grupa. W zależności od natury grup hydrofilowych surfaktanty można podzielić na [13-15]:

- kationowe – grupa hydrofilowa ma charakter jonu dodatniego,
- anionowe – grupa hydrofilowa ma charakter jonu ujemnego,
- amfoteryczne – posiadają zarówno grupę kationową, jak i anionową,
- niejonowe – grupa hydrofilowa nie posiada charakteru jonowego.

Najczęściej stosowane surfaktanty do tworzenia mikroemulsji typu w/o zostały przedstawione w tabeli 1 [13].

**Tabela 1.** Surfaktanty stosowane do tworzenia mikroemulsji w/o

Symbol	Nazwa	Rodzaj
TOMAC	chlorek trimetylooktyloamoniowy	kationowy
BDBAC	chlorek N-benzylo,N-dodecylo-N-bis(2-hydroksyetylo)amoniowy	kationowy
CTAB	bromek cetylometyloamoniowy	kationowy
AOT	2-dietyloheksylosulfobursztynian sodu	anionowy
ATR	di(tridecylo)-sulfobursztynian sodu	anionowy
DP-18	kwas diizostearylfosforowy	anionowy
DTDPA	kwas ditridecylofosforowy	anionowy
DOLPA	kwas dioleilofosforowy	anionowy
DLIPA	kwas dilinolenofosforowy	anionowy
	fosfatydylocholina	amfoteryczny
Brij	Polioksyeter	niejonowy
Span	ester monoalkilosorbitowy	niejonowy

Kationowe surfaktanty tworzą bardzo małe micelle  $w_0 < 3$ . Dodatek kosurfaktantu (korozpuszczalnika wspomagającego rozpuszczanie surfaktantów w rozpuszczalnikach organicznych) powoduje zmniejszenie wartości  $w_0$ , co wpływa na wzrost gęstości ładunku na powierzchni rozdziału faz, a w konsekwencji powierzchnia rozdziału faz staje się bardziej polarna. Cząsteczki kosurfaktantu mogą wchodzić między cząsteczki surfaktantu, w wyniku tego ulegają zmianie wzajemne oddziaływania pomiędzy hydrofilowymi głowami surfaktantu [16]. Anionowe surfaktanty tworzą duże micelle  $w_0 = 20-115$ , więc dodatek kosurfaktantu nie jest konieczny [17].

W systemach odwróconych miceli kosurfaktant odgrywa następującą rolę [13]:

- zwiększa rozpuszczalność surfaktantu w rozpuszczalnikach organicznych,
- buforuje silne oddziaływania odpychające pomiędzy jonami w grupach głównych surfaktantów, umożliwiając w ten sposób ich ściśle upakowanie i tworzenie rdzenia odwróconej miceli.

Jako kosurfaktanty stosuje się długołańcuchowe aminy, amidy, kwasy tłuszczowe, chloroform, jednak najczęściej używane są alkohole: n-butanol, n-pentanol, n-heksanol, n-heptanol, n-oktanol i alkohol benzylový [16,18].

### **Ekstrakcja białek w systemach odwróconych miceli**

Proces ekstrakcji enzymów w układzie odwróconej miceli składa się z dwóch operacji: ekstrakcji pierwotnej i ekstrakcji wtórnej. W ekstrakcji pierwotnej biomolekuły transportowane są z fazy wodnej do odwróconej miceli. W ekstrakcji wtórnej białka transportowane są z odwróconej miceli do świeżego roztworu wodnego [16].

Główną siłą napędową ekstrakcji białek są elektrostatyczne oddziaływania pomiędzy białkiem i surfaktantem. Transfer białek w ekstrakcji pierwotnej możliwy jest, jeżeli pH fazy wodnej pozwala osiągnąć białkom ładunek przeciwny do ładunku głowy surfaktantu. W ekstrakcji wtórnej, białka mają taki sam ładunek jak surfaktant, a dzięki wprowadzeniu do roztworu soli, wzrasta siła jonowa w układzie, która indukuje siły wzajemnego odpychania, zmniejsza się średnica miceli i białka wypychane są z jej wnętrza. Na ekstrakcję białek mogą również wpływać oddziaływania pomiędzy polarną częścią biomolekuł i hydrofobowym „ogonem” surfaktantu. W tym przypadku konieczna jest obecność w układzie alkoholu, np. izopropanolu, który zakłóca hydrofobowe interakcje podczas ekstrakcji wtórnej. Transferowi białek do odwróconej miceli sprzyja niska siła jonowa, podczas gdy wzrost siły jonowej wpływa korzystnie na ekstrakcję wtórną [19].

Białka (enzymy) mogą zostać wprowadzone do odwróconych miceli z zastosowaniem poniższych metod [20,21].

- Wstrzykiwanie – jest to metoda najczęściej stosowana. Niewielką ilość wodnego roztworu białka wprowadza się do roztworu surfaktantu w rozpuszczalniku organicznym i intensywnie wstrząsa, od kilku do kilkudziesięciu sekund, do powstania optycznie przezroczystego roztworu.

- Dodanie do roztworu surfaktantu w rozpuszczalniku organicznym odpowiedniej ilości wody (lub buforu) w celu osiągnięcia pożądanego stopnia hydratacji ( $w_0$ ) i następnie rozpuszczenie odwodnionych (np. liofilizowanych) preparatów białek przez intensywne wstrząsanie lub mieszanie. Rozpuszczenie białek może trwać od kilku minut do kilkudziesięciu godzin. W metodzie tej białka kontaktują się przez względnie długi czas z rozpuszczalnikiem organicznym i z reguły następuje ich częściowa denaturacja.
- Spontaniczny transfer białek w dwufazowym systemie składającym się w przybliżeniu z jednakowych objętości roztworu wodnego białek i rozpuszczalnika organicznego zawierającego surfaktant. Transfer białek następuje bez mieszania bądź z delikatnym mieszaniem i jest czasochłonny (od kilkudziesięciu minut do kilku dni). W tym czasie następuje interakcja białek z surfaktantem i rozpuszczalnikiem organicznym i białka mogą ulegać częściowej denaturacji.

Wydzielanie białek z systemów micelarnych można prowadzić przez [15]:

- Rozdział faz metodą fizyczną, na przykład poprzez zmianę temperatury, wówczas faza bogata w rozpuszczalnik organiczny zawierająca hydrofobowy produkt oddzielana jest od roztworu micelnego. Produkt ten można uzyskać w czystym stanie poprzez odparowanie rozpuszczalnika organicznego.
- Użycie membran półprzepuszczalnych w przypadku oddzielania związków niskocząsteczkowych z systemów micelarnych.
- Mieszanie z wodą lub wodnymi roztworami soli. Jest to tzw. ekstrakcja wtórna, w której składniki rozpuszczalne w wodzie przechodzą do fazy wodnej zastosowanej do tej ekstrakcji.
- Zniszczenie systemu micelnego poprzez dodanie mieszających się z wodą rozpuszczalników organicznych, takich jak aceton czy etanol. Metoda ta jest bardzo wydajna, gdy należy zachować strukturę i aktywność (wliczając aktywność katalityczną) białek. Dodatek alkoholu do miceli podczas ekstrakcji wtórnej powoduje ich pęcznienie i rozrywanie, a co za tym idzie, uwalnianie białek z układu.

Przedstawione metody wydzielania białek z odwróconych miceli mogą być stosowane w różnych kombinacjach, np. zmiana temperatury może być połączona z dodawaniem wody (lub buforu), roztworów soli czy rozpuszczalników organicznych [15,20].

Proces transferu białek z fazy wodnej do odwróconej miceli można podzielić na następujące etapy [22]:

- wędrówka białek z fazy wodnej do powierzchni rozdziału faz,
- wzajemne oddziaływania pomiędzy białkami a polarnymi grupami surfaktantów i tworzenie się odwróconych miceli,
- wędrówka odwróconej miceli do fazy rozpuszczalnika organicznego.

Struktura białek w odwróconych micelach zależy od warstwy surfaktantu, rozmiaru odwróconej miceli oraz miejsca rozpuszczenia białka. Białka, które są zlokalizowane przy powierzchni rozdziału faz miceli (takie jak cytochrom

c i lizozym) zmieniają swoją drugorzędową i trzeciorzędową strukturę wraz z obniżeniem się wartości  $w_o$ . Hydrofilowe białka rozpuszczają się głównie we wnętrzu wody micelarnej i zmieniają swoją strukturę trzeciorzędową w niskim przedziale wartości  $w_o$ , wówczas rozmiar miceli jest porównywalny do wymiarów białek. Umieszczenie biomolekuły w miceli i jej wielkość wpływają na oddziaływanie tego białka z powierzchnią rozdziału faz [18].

Transfer białek z fazy wodnej do odwróconej miceli zależy nie tylko od składu obu faz, ale także od właściwości badanych białek. Ważną rolę odgrywają tu oddziaływania elektrostatyczne. Transfer białek zachodzi tylko wtedy, gdy surfaktant i białko mają przeciwne ładunki i w większości przypadków wzrost siły jonowej roztworu prowadzi do zmniejszenia tego transferu. Białka o małej masie cząsteczkowej przenoszone są do odwróconej miceli anionowego surfaktantu, np. AOT z roztworu o pH nieco mniejszym od ich punktu izoelektrycznego, w przypadku białek o większej masie cząsteczkowej problem jest bardziej skomplikowany. W tym przypadku ekstrakcja białek do odwróconych miceli zachodzi przy wartościach pH roztworu odleglejszych od wartości ich punktu izoelektrycznego, co więcej jest ona trudniejsza i w niektórych przypadkach nie zachodzi ze 100% wydajnością [23].

### **Czynniki wpływające na ekstrakcję białek w systemach odwróconych miceli**

Rozdzielenie białek pomiędzy micelną fazę organiczną i fazę wodną zależy w dużej mierze od ich właściwości, tj. wartości pH, siły jonowej, typu rozpuszczonej soli, a także od stężenia i typu surfaktantu rozpuszczonego w miceli, obecności kosurfaktantu oraz rodzaju rozpuszczalnika. Na rozpuszczalność biomolekuł znaczny wpływ wywiera też temperatura oraz parametry charakteryzujące dane białko: wartość punktu izoelektrycznego, wielkość, kształt, hydrofobowość [6,23].

#### **Surfaktant**

Struktura surfaktantu rozpuszczonego w fazie organicznej ma znaczący wpływ na stopień ekstrakcji białka, a w szczególności hydrofobowa część surfaktantu (ogon) odpowiedzialna jest za wysoki współczynnik ekstrakcji [11].

Ze wzrostem stężenia surfaktantu stosowanego do otrzymywania odwróconej miceli rośnie rozpuszczalność białka w jej wnętrzu, ale jednocześnie z drugiej strony – większe stężenie surfaktantu sprawia trudności w transferze wtórnym białek do fazy wodnej. Dlatego optymalne stężenie surfaktantu w dwuetapowym transferze białek w układzie odwróconej miceli powinno być równe minimalnej wartości granicznej niezbędnej do osiągnięcia maksymalnego transferu białka do fazy organicznej [6].

Ilość surfaktantu wywiera także wpływ na aktywność katalityczną enzymu. Reakcje enzymatyczne w układach odwróconych miceli są determinowane stężeniem surfaktantu, ponieważ wraz ze zmianą jego stężenia zmienia się charakterystyka (rozmiar, kształt) mikroagregatów micelarnych [10].

Wielkość ekstrahowanego białka wpływa znacząco na jego ekstrakcję. Przy niskich stężeniach surfaktantu w roztworze, białka o mniejszej masie cząsteczkowej łatwiej przechodzą do odwróconej miceli niż białka o dużej masie cząsteczkowej. Dla białek o masie > 100 000 Da zaleca się zwiększenie stężenia surfaktantu w fazie organicznej [6].

Stobbe i wsp. [24] zbadali wpływ stężenia surfaktantu na ekstrakcję  $\alpha$ -chymotrypsyny w systemie odwróconej miceli AOT/izopropanol. Ekstrakcja była przeprowadzona przy stężeniach AOT w przedziale od 0 do 4%. Stwierdzili, że stopień ekstrakcji  $\alpha$ -chymotrypsyny zależy od stężenia AOT w układzie odwróconej miceli. Przy braku AOT w roztworze enzymu nie udało się wyekstrahować. Wraz ze wzrostem stężenia AOT do 4% stopień ekstrakcji  $\alpha$ -chymotrypsyny wzrastał do 70% w przypadku ekstrakcji pierwotnej oraz do 39% w przypadku ekstrakcji wtórnej.

Umesh Hebbar i wsp. [25] w swoich badaniach dotyczących oczyszczania bromelaniny (otrzymanej z odpadów ananasa) zastosowali kationowy surfaktant CTAB o stężeniach 50-200 mM rozpuszczony w mieszaninie izooktan/heksanol/butanol. Zaobserwowali oni wzrost wydajności ekstrakcji białka wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu z 50 do 150 mM. Powyżej tego stężenia wydajność ekstrakcji malała.

Goto, Hatton i wsp. [11] zbadali stopień ekstrakcji cytochromu c przy użyciu różnych roztworów surfaktantów AOT, ATR, DP-18, DTDPA, DOLPA, DLIPA w izooktanie. Układy odwróconych miceli zawierające surfaktanty DTDPA i DOLPA charakteryzowały się dużą wydajnością ekstrakcji cytochromu c, nawet przy niskich stężeniach, podczas gdy izooktan zawierający AOT jest efektywnym ekstrahentem jedynie przy wysokich stężeniach tego surfaktantu. Wyniki te pokazały, że sama obecność odwróconej miceli nie jest wystarczającym warunkiem dla transferu białek z fazy wodnej do fazy organicznej.

### **pH roztworu**

Polarne grupy chemiczne na powierzchni molekuly białka wykazują ładunek zależny od pH roztworu. Elektrostatyczne oddziaływania pomiędzy białkiem i „głową” surfaktantu sprzyjają jego rozpuszczeniu wewnątrz odwróconej miceli przy założeniu, że białko i grupa główna surfaktantu mają przeciwne ładunki. W przypadku enzymów, takich jak cytochrom c i lizozym ich transport z fazy wodnej do organicznej, w układach odwróconych miceli zawierających anionowy surfaktant, zachodzi wówczas, jeżeli pH roztworu ma niższą wartość niż pI białka (białka są naładowane dodatnio). Jeżeli pH fazy wodnej przyjmuje wartości większe niż punkt izoelektryczny białek, zachodzi wówczas ekstrakcja wtórna, czyli transfer białek z miceli do „świeżej” fazy wodnej. W przypadku kationowych surfaktantów występuje zjawisko odwrotne [26].

### **Stopień hydratacji**

Parametr  $w_0$  decyduje o rozmiarze odwróconej miceli, a także wpływa na aktywność białek enzymatycznych „uwięzionych” w jej wnętrzu. Zwykle w celu

zachowania optymalnej aktywności katalitycznej tych enzymów wartości  $w_0$  powinny mieścić się w granicach od 5 do 15 [10]. Biasutti [27] zaobserwował maksymalną aktywność hydrogenazy z *Desulfovibrio gigas* zamkniętej w odwróconej miceli AOT dla  $w_0 = 18$ . Stwierdził on, że enzym „uwięziony” w odwróconej miceli wykazuje optymalną aktywność przy takich wartościach  $w_0$ , dla których rozmiar miceli zbliżony jest do rozmiaru tego enzymu.

Znajomość stosunku molowego wody do surfaktantu jest również bardzo ważna w celu określenia struktury i wielkości odwróconych miceli oraz liczby cząsteczek surfaktantu przypadających na odwróconą micelę. Zmienne, które wyraźnie wpływają na wartość  $w_0$  to typ surfaktantu i jego stężenie, temperatura, stężenie kosurfaktantu i siła jonowa [28].

### Temperatura

Temperatura prowadzenia procesu micelizacji wywiera istotny wpływ na strukturę miceli oraz parametry fizykochemiczne układu. Wraz ze wzrostem temperatury wzrasta rozpuszczalność białek oraz ogólna wydajność ich ekstrakcji [29]. Farney i wsp. [30] uzyskali prawie dwukrotnie większy odzysk aktywności glukoamylazy w wyniku ekstrakcji w temp. 38°C w porównaniu z ekstrakcją w temperaturze pokojowej. Noritomi i wsp. [29] zbadali wpływ temperatury na ekstrakcję lizozymu w układzie odwróconej miceli zawierającej surfaktant DK-F-110 (ester kwasów tłuszczowych i sacharozy) w mieszaninie izooktanu i n-butanolu (7:3 v/v). Obniżenie temperatury ekstrakcji poniżej 20°C spowodowało zmniejszenie stopnia ekstrakcji pierwotnej lizozymu, a w temperaturze poniżej 10°C faza organiczna odwróconej miceli uległa zmętnieniu, co wynika prawdopodobnie ze zmniejszenia rozpuszczalności surfaktantu DK-F-110.

### Obecność jonów

Główną siłą napędową ekstrakcji białek w systemach odwróconych miceli stanowią oddziaływania między białkami a grupami hydrofilowymi surfaktantu. Duża siła jonowa fazy wodnej wewnątrz miceli zmniejsza oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy białkiem i surfaktantem, w wyniku tego tworzone są mniejsze micelle [6]. Z kolei obniżenie siły jonowej fazy wodnej poniżej pewnej wartości powoduje brak rozdziału faz w odwróconych micelach i tworzenie trwałych mikroemulsji. Dlatego transfer białek pomiędzy fazami wymaga minimalnej wartości siły jonowej rozpuszczalnika wodnego [6].

Yu i wsp. [31] w swoich badaniach wykazali, że stężenia KCl poniżej 0,5 mol/dm<sup>3</sup> zwiększają rozpuszczalność drożdżowej lipazy w odwróconej miceli AOT/izooktan. Przy stężeniu jonów większym niż 0,5 mol/dm<sup>3</sup> oddziaływania elektrostatyczne są całkowicie zahamowane i białko nie jest ekstrahowane.

Według Goklena i Hattona [32] minimalne stężenie KCl niezbędne do ilościowego transferu cytochromu c w układzie AOT/izooktan wynosi 0,1 M.

Również rodzaj soli w fazie wodnej może mieć wpływ na wydajność transferu białek pomiędzy fazami. Najczęściej w ekstrakcji pierwotnej białek

w układzie odwróconej miceli stosowane są sole: LiCl, NaCl, KCl, BaCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> w stężeniu od 0,1 do 1,0 M [6].

### Zastosowania odwróconych miceli

W wielu laboratoriach prowadzone są badania nad wybiórczą rozpuszczalnością białek w odwróconych micelach i możliwością zastosowania tej metody do odzyskiwania i oczyszczania białek na dużą skalę. Użycie odwróconych miceli do frakcjonowania białek jest atrakcyjnym narzędziem w biotechnologii [20].

W rozpuszczalnikach organicznych stanowiących medium reakcyjne zachodzi często denaturacja enzymów. W odwróconych micelach enzymy są odizolowane od rozpuszczalnika przez warstwę surfaktantu i jest to cenna zaleta tych systemów enzymatycznych.

Odwrócone micelle mogą także zminimalizować inne problemy towarzyszące reakcjom enzymatycznym zachodzącym w wodzie. Jeżeli zachodzi zjawisko inhibicji produktem i produkt ten jest preferencyjnie rozpuszczalny w rozpuszczalniku organicznym, a enzym wykazuje aktywność w obecności układów difazowych woda-rozpuszczalnik, to istnieje możliwość przeprowadzenia tej reakcji z większą wydajnością w układzie miceli odwróconych [8].

Wybiórcze rozdzielanie białek z wykorzystaniem odwróconych miceli zademonstrowali po raz pierwszy w 1987 roku Goklen i Hatton [32]. Autorzy ci użyli mieszaniny czystych białek – rybonukleazy A, cytochromu c i lizozymu. Technika ta została zaprezentowana również w 1990 przez Camarinha-Vicente [33] i w 1991 roku przez Aires-Barros i Cabral [34] do rozdzielania nieoczyszczonego preparatu lipolitycznego pochodzącego z *Chromobacterium viscosum* w układzie odwróconej miceli AOT/izooktan. Preparat ten zawierał dwie lipazy o różnej masie cząsteczkowej i o różnym punkcie izoelektrycznym (lipaza A o masie 120000 Da i pI 3,7 i lipaza B o masie 30000 Da i pI 7,3). Lipaza B została całkowicie rozpuszczona w odwróconej miceli AOT/izooktan o pH 6,0 i słabej sile jonowej (50 mM KCl), natomiast lipaza A pozostawała w fazie wodnej. Przy tej wartości pH, lipaza B posiadała ładunek dodatni i łatwo rozpuszczała się w fazie organicznej, natomiast lipaza A nie została wyekstrahowana ze względu na rozmiar i efekty elektrostatyczne. Lipaza B rozpuszczała się dobrze w fazie organicznej zawierającej AOT przy wartościach pH wyższych od pI białka.

Reekstrakcję lipazy B z fazy organicznej odwróconej miceli uzyskano poprzez wprowadzenie do układu hydrofilowego rozpuszczalnika organicznego. Najlepsze wyniki osiągnięto stosując dodatek 2,5% (v/v całkowitej objętości roztworu) etanolu przy pH 9,0 i przy tej samej sile jonowej, jakiej użyto przy ekstrakcji pierwotnej. Etanol minimalizował oddziaływania hydrofobowe pomiędzy lipazą i surfaktantem i/lub organicznym rozpuszczalnikiem, umożliwiając jej przejście do fazy wodnej. Wydajność procesu wyniosła 77% [33,34].

Technikę ekstrakcji enzymów z podłoża hodowlanego w układzie odwróconej miceli zaprezentował po raz pierwszy Rahman [35] w 1988 roku. Wyekstrahował wówczas alkaliczną proteazę z *Bacillus sp.* z podłoża pofermentacyjnego przy użyciu rozpuszczalnika organicznego AOT w izooktanie.

W 1992 roku Krei i Hustedt [36] zastosowali technikę ekstrakcji ciecz-ciecz do wydobycia pozakomórkowego enzymu  $\alpha$ -amylazy z cieczy pochodzącej z *Bacillus licheniformis*. Użyli oni do tego celu odwróconej miceli zawierającej CTAB (bromek heksadecylotrimetyloamoniowy) w mieszaninie izooktan/heksanol (0,95:0,05). W dwustopniowej ekstrakcji prowadzonej z fazy wodnej o pH 8,8-10,0 maksymalna wydajność procesu wyniosła 89%.

Z wykorzystaniem odwróconych miceli można także ekstrahować i oczyszczać białka wewnątrzkomórkowe. W 1987 roku Giovenco [37] zastosował odwróconą micelę zawierającą 0,2 M CTAB w mieszaninie oktan/heksanol do wydzielenia enzymów wewnątrzkomórkowych. Jako model wybrane zostały trzy dehydrogenazy (dehydrogenaza  $\beta$ -hydroksybutylowa, dehydrogenaza izocytrynianowa i dehydrogenaza glukozy-6-fosforanu) pochodzące z bakterii *Actobacter vinelandii*. Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanu nie rozpuszczała się w odwróconej miceli, co najprawdopodobniej spowodowane było dużym rozmiarem jej cząsteczki (200000 Da).

Stosowanie odwróconych miceli do ekstrakcji enzymów metodą ciągłą zostało zademonstrowane w 1986 roku przez Dekkera [38]. Zastosowano proces podwójnej ekstrakcji  $\alpha$ -amylazy w układzie odwróconej miceli TOMAC/izooktan. Ekstrakcję prowadzono w dwóch zbiornikach zaopatrzonych w mieszaninę, a utworzona odwrócona micela była zawracana w czasie trwania ekstrakcji. Sprawność procesu spadała po trzech cyklach i konieczne było wówczas dodanie większej ilości surfaktantu do fazy organicznej. Podczas ekstrakcji następowała strata surfaktantu (<15% na jeden cykl) i gromadził się on na powierzchni rozdziału faz razem z denaturowanym białkiem. W procesie tym  $\alpha$ -amylaza została wyekstrahowana z wydajnością 70%.

## Literatura

1. Eriksson S, Nylén U, Rojas S, Boutonnet M. Preparation of catalysis from microemulsions and their applications in heterogeneous catalysis. *Appl. Catal.* **2004**, 265:207-219.
2. Stamatis H, Xenakis A, Kolisis FN. Bioorganic reactions in microemulsions: the case of lipases. *Biotechnol. Adv.* **1999**, 17:293-318.
3. Rodakiewicz-Nowak J. Układy micelarne i mikroemulsje w katalizie enzymatycznej. *Biotechnologia* **2003**, 4:47-61.
4. Winsor PA. Hydrotropy, solubilization, and related emulsification processes. Part I. *Trans. Faraday Soc.* **1948**, 44:376-398.
5. Carvaiho CML, Cabral JMS. Reverse micelles as reaction media for lipases. *Biochimie* **2000**, 82:1063-1085.
6. Pires MJ, Aires-Barros MR, Cabral JMS. Liquid-liquid extraction of proteins with reversed micelles. *Biotechnol. Prog.* **1996**, 12:290-301.
7. Tascioglu S. Micellar solutions as reaction media. *Tetrahedron* **1996**, 52:11113-11152.
8. Sheild JW, Fergusson HD, Bommarlus AS, Hatton TA. Enzymes in reversed micelles as catalysts for organic-phase synthesis reactions. *Ind. Eng. Chem. Fundam.* **1986**, 25:603-612.

9. Shervani Z, Ikushima Y. Determination of hydrodynamic radius of AOT reverse micelles prepared in near-critical propane. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **2000**, 164:307-313.
10. Krieger N, Taipa MA, Aires-Barros MR, Melo EHM, Lima-Filho JL, Cabral JMS. Purification of the *Penicillium citrinum* lipase using AOT reversed micelles. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **1997**, 69:77-85.
11. Goto N, Ono T, Nakashio F, Hatton A. Design of surfactants suitable for protein extraction by reversed micelles. *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, 54:26-32.
12. Jańczuk B, Wójcik W, Zdziennicka A, Gonzalez-Martin ML, Bruque JM. Swobodna energia międzyfazowa a swobodna energia adsorpcji i micelizacji substancji powierzchniowo-czynnych. *Wiad. Chem.* **2000**, 54:795-814.
13. Rosen MJ. *Surfactants and interfacial phenomena*. Wiley-Interscience, Hoboken, **2004**, pp. 105-144.
14. [http://hermes.umcs.lublin.pl/~radchem1/home/ex-coll/K1\\_cmc.pdf](http://hermes.umcs.lublin.pl/~radchem1/home/ex-coll/K1_cmc.pdf), Procesy agregacji w układach surfaktantów. 20.03.2010.
15. Ono T, Goto M. *Interfacial Phenomena. Bioseparation through liquid-liquid interfaces*. Springer US, **2005**, pp. 287-302.
16. Mathew MM, Juang R-S. Role of alcohols in the formation in inverse microemulsion and back extraction of proteins/enzymes in a reverse micellar system. *Sep. Purif. Technol.* **2007**, 53:199-215.
17. Cardoso MM, Barradas MJ, Kroner KH, Crespo JG. Amino acid solubilisation in cationic reversed micelles: factors affecting amino acid and water transfer. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1999**, 74:801-811.
18. Tonova K, Lazarova Z. Reversed micelle solvents as tools of enzyme purification and enzyme-catalyzed conversion. *Biotechnol. Adv.* **2008**, 26:516-532.
19. Ferreira LFP, Taqueda ME, Vitolo M, Converti A, Pessoa Jr. A. Liquid-liquid extraction of commercial glucose oxidase by reversed micelles. *J. Biotechnol.* **2005**, 116:411-416.
20. Levashov AV, Klyachko NL. *Micellar enzymology methodology and technique*. Russ. Chem. B+, International Edition **2001**, 50:1718-1732.
21. Rodakiewicz-Nowak J, Steczko J. Apolarne układy micelarne w katalizie enzymatycznej. *Wiad. Chem.* **2000**, 54:795-814.
22. Brandani S, Brandani V, Di Giacomo G, Spera L. Effect of nonlinear equilibrium on the mass transfer rate of  $\alpha$ -amylase extraction by reversed micelles. *Proc. Biochem.* **1996**, 31:249-252.
23. Wolbert RBG., Hilhorst R, Voskuilen G, Nachtegaal H, Dekker M. Protein transfer from an aqueous phase into reversed micelles, *Eur. J. Biochem.* **1989**, 184:627-633.
24. Stobbe H, Yunguang X, Zihao W, Jufu F. Development of a new reversed micelle liquid emulsion membrane for protein extraction. *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, 53:267-273.
25. Umesh Hebbar H, Sumana B, Raghavarao KSMS. Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. *Biosource Technol.* **2008**, 99:4896-4902.
26. Soni K, Madamwar D. Reversed micellar extraction of an extracellular acid phosphatase from fermentation broth, *Proc. Biochem.* **2000**, 36:311-315.
27. Biasutti MA, Abuin EB, Silber JJ, Correa MM, Lissi EA. Kinetics of reactions catalyzed by enzymes in solutions of surfactants. *Adv. Colloid Interfac.* **2008**, 136:1-24.

28. Kilikian BV, Bastazin MR, Minomi NM, Goncalves EMR, Junior AP. Liquid-liquid extraction by reversed micelles in biotechnological processes. *Braz. J. Chem. Eng.* **2000**, 17:29-38.
29. Noritomi H, Kojima N, Kato S, Nagahama K. How can temperature affect reverse micellar extraction using sucrose fatty acid ester? *Colloid Polym. Sci.* **2006**, 284:683-687.
30. Farney CE, Glatz ChE. Extraction of charged fusion proteins in reversed micelles: comparison between different surfactant systems. *Biotechnol. Prog.* **1995**, 11:260-264.
31. Yu Y-Ch, Chu Y, Ji J-Y. Study of the factors affecting the forward and back extraction of yeast-lipase and its activity by reverse micelles. *J. Colloid Interf. Sci.* **2003**, 267:60-64.
32. Goklen KE, Hatton TA. Liquid-liquid extraction of low molecular proteins by selective solubilization in reversed micelles. *Sep. Sci. Technol.* **1987**, 22:831-841.
33. Camarinha-Vicente MLC, Aires-Barros MR, Cabral JMS. Purification of *Chromobacterium viscosum* lipases using reverse micelles. *Biotechnol. Tech.* **1990**, 4:137-142.
34. Aires-Barros MR, Cabral JMS. Selective separation and purification of two lipases from *Chromobacterium viscosum* using AOT reversed micelles. *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, 38:1302-1307.
35. Rahaman RS, Chee JY, Cabral JMS, Hatton TA. Recovery of an extracellular alkaline protease from whole fermentation broth using reverse micelles. *Biotechnol. Prog.* **1988**, 4:217-224.
36. Krei GA, Hustedt H. Extraction of enzymes by reverse micelles. *Chem. Eng. Sci.* **1992**, 47:99-111.
37. Giovenco S, Laane C, Hilhorst R, Neijssed OM, van der Meer RR, Luyben KChAM. Proceedings of the 4th European Congress on Biotechnology. Amsterdam, **1987**, 2, pp. 503-506.
38. Dekker M, Van't Riet K, Weijers SR, Baltussen JWA, Laane C, Bijsterbosh BH. Enzyme recovery by liquid-liquid extraction using reversed micelles. *Chem. Eng. J.* **1986**, 33:327-333.

## Protein extraction with reversed micelles

### Summary

Reversed micelles, or water-in-oil microemulsions are three-component systems, that consist water, surfactant molecules and organic solvent. They can be used for liquid-liquid extraction to purificate and recovery proteins and other molecules. Reversed micelles are attractive tools for biotechnology because extraction in this systems is cheap, efficient and easy to scale up. Efficiency of protein extraction and solubilization in reversed micelles depends on many factors like pH, ionic strength, surfactant type and concentration.

The present review describes the process of protein extraction in reversed micellar systems and shows potential applications of it. It also specify and describe factors that affect liquid-liquid extraction.