



Doctoral Thesis

Anwendung von W/O Mikroemulsionen in der Extraktion von Aminosäuren und Proteinen

Author(s):

Leser, Martin E.

Publication Date:

1988

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000579542> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

11. Nov. 1988

Diss. ETH Nr. 8697

**ANWENDUNG VON W/O MIKROEMULSIONEN
IN DER EXTRAKTION VON
AMINOSÄUREN UND PROTEINEN**

Rehug - Luis

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Naturwissenschaften
der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von
Martin E. Leser
Dipl. Natw. ETH
geboren am 25. März 1958
von Freiburg/Brsg. (Deutschland)

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. P. L. Luisi, Referent
Prof. Dr. W. Simon, Korreferent

ADAG Administration & Druck AG

Zürich 1988

11. Kurzfassung

Tenside können, je nach ihrer Struktur, in apolaren Lösungsmitteln Umkehrmizellen bilden. Diese spheroidalen Aggregate haben die Fähigkeit, eine gewisse Menge Wasser oder wasserlösliche, wie auch wasserunlösliche Komponenten zu solubilisieren. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Anwendung dieser Tatsache in der Extraktion von einigen Aminosäuren und Proteinen in AOT/Isooktan- und CTAB/Isooktan/n-Hexanol 1:1 (v/v) invertiert mizellare Lösungen mit Hilfe der Phasentransfer- bzw. der Festkörperextraktionsmethode.

Im ersten Teil wurde das Extraktionsverhalten in den Phasentransferexperimenten beschrieben. In dieser experimentellen Konfiguration werden die Komponenten in einer wässrigen Salzlösung vorgegeben und mit einer organischen invertiert mizellaren Lösung versetzt. Es wurden dabei die basischen Enzyme Lysozym, Ribonuklease A, Trypsin, das saure Pepsin sowie die Aminosäuren H-Trp-OH, H-Trp-OMe, Ac-Trp-OH, Ac-Trp-OMe und H-Tyr-OH, H-Tyr-OMe, Ac-Tyr-OH, Ac-Tyr-OMe untersucht. Es hat sich gezeigt, dass der in der wässrigen Phase vorgelegte pH, die Salzart und deren Konzentration die Effizienz der Proteinextraktion in die AOT-Umkehrmizellen entscheidend beeinflussen. Haben die Proteine oder Aminosäuren eine positive Gesamtladung, so werden sie bevorzugt in die negativ geladenen AOT-Umkehrmizellen solubilisiert. Tragen sie hingegen eine negative Gesamtladung, so werden sie vor allem in die positiv geladenen CTAB-Umkehrmizellen transferiert. Dieser elektrostatische Effekt konnte schliesslich in der Trennung eines Gemisches von ${}^+\text{H}_2\text{-Phe-OMe}$ und Ac-Trp-O^- in einem 3-Phasensystem, in dem die wässrige Phase sich zwischen einer CTAB- bzw. einer AOT-invertiert mizellaren Phase befand, angewendet werden. Neben diesen elektrostatischen Wechselwirkungen spielen hydrophobe Kräfte

ebenfalls eine wesentliche Rolle. Diese kommen vor allem in der Solubilisation von neutral oder ungeladenen Verbindungen zum Tragen.

Im allgemeinen konnte mit einer kleineren wässrigen Salzkonzentration (verwendet wurden wässrige KCl, NaCl, CaCl₂ und MgCl₂-Lösungen mit einer Salzkonzentration, die zwischen 0.05 und 1 M lag) ein effizienterer Stofftransfer in die AOT-Umkehrmizellen beobachtet werden. Die gleichzeitig zum Proteintransfer stattfindende Wassersolubilisation war ebenfalls von der Salzart und -konzentration abhängig. Sie wurde hingegen von der Anwesenheit der Proteine oder Aminosäuren nicht signifikant beeinflusst.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Festkörperextraktionsmethode, in der die Komponenten in kristalliner Form mit einer invertiert mizellaren Lösung versetzt werden. Es konnte gezeigt werden, dass für die wasserlöslichen Aminosäuren (H-Tyr-OH, H-Tyr-OMe, Ac-Tyr-OH, Ac-Tyr-OMe, H-Tyr-NH₂, H-Trp-OH, Ac-Trp-OH, H-Trp-OMe, Ac-Trp-OMe) die Solubilisationseffizienz mit der Zunahme des in den Umkehrmizellen (es wurde ausschliesslich das System AOT/Isooktan/Wasser verwendet) vorgegebenen Wassergehaltes (w_0 -Wert) stieg. Hingegen konnte für die schlechter in bidestilliertem Wasser löslichen Aminosäuren BOC-Trp-OH, Z-Trp-OH, BOC-Tyr-OH, Z-Tyr-OH, BOC-O-Benzyl-Tyr-OH und den Dipeptiden Z-Ala-Phe-OMe bzw. Z-Gly-Phe-Trp-OH keine signifikante Abhängigkeit der Lösungseffizienz vom w_0 -Wert in den AOT-Umkehrmizellen gefunden werden.

Das Solubilisationsverhalten von α -Chymotrypsin, Trypsin, Papain und Pepsin ist demjenigen der wasserlöslichen Aminosäuren im wesentlichen sehr ähnlich. Dasjenige der kleineren Proteine Lysozym, Ribonuklease A und Cytochrom c unterschied sich hingegen deutlich im Bereich der kleinen w_0 -Werte. Es konnte gezeigt werden, dass die für diese hydrophilen Proteine unerwartete maximale Löslichkeit bei kleinem w_0 -Wert auf Grund von günstigen elektrostatischen Wechselwirkungen mit den Kopfgruppen der AOT-Mizellenwand zu Stande kommt.

Im dritten Teil der Arbeit wurden die erarbeiteten Grundlagen in der Extraktion von Proteinen aus einem "E. coli" Lyophilisat und in der Extraktion von Proteinen, Fetten und kleineren Komponenten aus dem Sonnenblumen- bzw. Soja-Bohnenmehl erfolgreich angewendet.

12. Abstract

Surfactants are known to form reverse micelles in apolar solvents. These spheroidal aggregates can solubilize a certain amount of water or water soluble and water insoluble compounds. The presented work is dealing with the application of this fact in the extraction of some amino acids and proteins into AOT/isooctane or CTAB/isooctane/n-hexanol 1/1 (v/v) micellar solutions with the help of the "phase-transfer method" and the "solid-phase extraction method".

The first part is dealing with the extraction behavior in the phase-transfer experiments. In this configuration the compounds are given in an aqueous salt solution which is in contact with a reverse micellar solution. Both some basic enzymes as lysozyme, ribonuclease A, trypsin, the acid pepsin and some amino acids as H-Trp-OH, H-Trp-OMe, Ac-Trp-OH, Ac-Trp-OMe, H-Tyr-OH, H-Tyr-OMe, Ac-Tyr-OH, Ac-Tyr-OMe were used in the experiments. It is shown that the pH, the salt-type, its concentration and the surfactant-type influence very much the transfer efficiency of the compounds into the AOT-micellar solution. If the proteins or amino acids have a positive overall charge, they are preferentially solubilized into the negatively charged AOT micelles. But if they have a negative overall charge they are better extracted into the positively charged CTAB micelles. This electrostatic effect was finally used for the separation of $^+H_2$ -Phe-OMe and Ac-Trp-O $^-$ in a 3-phase system, where the amino acids were initially in an aqueous salt solution which was in contact with both an AOT and a CTAB reverse micellar solution. Beside of the electrostatic interactions also hydrophobic forces are influencing the extraction behavior of the compounds. These interactions are especially important in the extraction of uncharged molecules.

The phase transfer efficiency was also influenced by the salt concentration in the aqueous solution (KCl, NaCl, CaCl₂, MgCl₂; concentrations were between 0.05 and 1M). The less the salt concentration was, the better the compounds were extracted into the AOT reverse micelles. However, the transfer efficiency of the investigated amino acids and proteins was not significantly influenced by the simultaneously occurring water solubilization in the reverse micellar solution.

The second part of this work is dealing with the solid-phase extraction method. In this experimental configuration the compounds are given in their solid state. It was shown that for the water soluble amino acids (H-Tyr-OH, H-Tyr-OMe, Ac-Tyr-OH, Ac-Tyr-OMe, H-Tyr-NH₂, H-Trp-OH, Ac-Trp-OH, H-Trp-OMe, Ac-Trp-OMe) the solubilization efficiency was increased with the initially in the AOT reverse micelles solubilized water amount. Whereas for the less water soluble compounds (BOC-Trp-OH, Z-Trp-OH, BOC-Tyr-OH, Z-Tyr-OH, BOC-O-Benzyl-Tyr-OH, Z-Ala-Phe-OMe, Z-Gly-Phe-Trp-OH) there was no significant influence of the micellar water content on the solubilization efficiency.

The solubilization behavior of α -chymotrypsin, trypsin, papain and pepsin is similar to the behavior of the water soluble amino acids. Whereas the behavior of the smaller proteins lysozyme, ribonuclease A and cytochrome c was significantly different, especially in the extraction efficiency into AOT reverse micelles with a low water content ($w_0 < 8-10$). It was shown that the unexpected high solubilization efficiency into these reverse micelles was mainly due to favorable interactions of the proteins with the headgroups of the AOT molecules.

In the last part of the work it was tried to apply the AOT reverse micellar solution in the extraction of proteins from an E. coli mixture and in the selective extraction of proteins, oil and smaller compounds from a meal prepared from sunflower and soybean seeds.