

國立交通大學

應用化學研究所

碩士論文

應用親和性離子液體於溶菌酶之萃取

Extraction of Lysozyme Using a Dye-modified

Ionic Liquid

研究生：曾鈺評

指導教授：余 艇 博士

中華民國九十六年六月

應用親和性離子液體於溶菌酶之萃取

Extraction of Lysozyme Using a Dye-modified
Ionic Liquid

研究生：曾鈺評
指導教授：余艇 博士

Student：Yu-ping Tzeng
Advisor：Dr. Tiing Yu

國立交通大學
應用化學研究所
碩士論文



Submitted to Institute of Applied Chemistry
National Chiao Tung University
in partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of
Master of Science
in
Applied Chemistry
June 2007
Hsinchu, Taiwan, Republic of China.

中華民國九十六年六月

應用親和性離子液體於溶菌酶之萃取


學生：曾鈺評

指導教授：余 艇

國立交通大學應用化學所

摘要

近年來，室溫離子液體(room temperature ionic liquids, ILs)已廣泛應用於液相/液相萃取、有機合成及催化反應等研究領域。由於離子液體提供較為安全的實驗環境且可回收再利用，能減低對環境的污染，取代傳統有機溶劑，因此被視為綠色溶劑。



在生物分子液相/液相萃取方面，已有研究發現離子液體可應用於萃取胺基酸和蛋白質，但是萃取並無選擇性。Cibacron Blue F-3GA(CB3GA)是一對蛋白質有親和性的染料配體，本實驗利用CB3GA 取代[BMIM][Cl]的陰離子，合成為具有親和性的離子液體[BMIM]₃[CB3GA]，將其作為萃取劑，溶於疏水性離子液體[BMIM][PF₆]，從水溶液中萃取蛋白質溶菌酶(lysozyme)。

以含有3.8 mM [BMIM]₃[CB3GA]之離子液體[BMIM][PF₆]，對500 mg/L 溶菌酶水溶液做萃取，在pH 4.0條件下，正向萃取率約為95%。再以1.0M KCl，pH 8.0水溶液將溶菌酶萃取回水相，其反向萃取

率約為93 %，溶菌酶回收率為87 %。隨著pH值降低，正向萃取率越好，反向萃取則相反。此液相/液相萃取系統對於溶菌酶不論是正向萃取或反向萃取，反應很快即能達到平衡。另外，我們也嘗試萃取蛋白質混合溶液，發現對於溶菌酶有相當程度的選擇性。因此，此親和性離子液體具備蛋白質純化和分離的潛力。



Extraction of Lysozyme Using a Dye-modified Ionic Liquid

Student : Yu-ping Tzeng

Advisor : Tiing Yu

Institute of Applied Chemistry
National Chiao Tung University

Abstract

In recent years, room temperature ionic liquids (ILs) have been applied to broad research fields, such as liquid /liquid extractions, organic syntheses and catalytic reactions. ILs are recyclable and relatively safer than traditional volatile organic compounds (VOCs), so they are regarded as green solvents.

It has been found that ionic liquids can be used in extracting amino acids and proteins from aqueous solutions, however, without selectivity. Cibacron Blue F-3GA (CB3GA) is an affinity dye which has been widely used for protein purification. In this study, IL [BMIM]₃[CB3GA] synthesized as an extraction agent, was dissolved in a water-immiscible IL 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([BMIM][PF₆]) for extraction of lysozyme.

The forward extraction efficiency for lysozyme was 95% using a [BMIM][PF₆] solution containing 3.8 mM [BMIM]₃[CB] while the aqueous phase was pH 4.0. Lysozyme was then extracted back to another aqueous solution of a buffer solution of pH 8.0 with 1.0M KCl. The back extraction efficiency was 93%, thus the lysozyme recovery was 87% for the complete process. As the pH of the aqueous solution decreased, the forward extraction efficiency increased, while the back extraction

efficiency decreased. Both the forward and back processes were found reaching equilibrium in very short time. In addition, a protein mixture was tested to examine the selectivity of this extraction system. The preliminary outcome showed good selectivity for lysozyme. This dye-modified IL may provide a potential for protein separation and purification.



謝誌

回首兩年研究生涯的點點滴滴，科二前桃紅的櫻花、粉嫩的杜鵑總讓人賞心悅目，在大廳沙發上睡覺的校狗、小七的親切態度和充斥校園的好人，都將留在回憶裡，如今伴隨蟬鳴而來的鳳凰花，意味著另一段新的旅程即將開始。感謝身旁的人、事、物讓我碩士班的生活是如此豐富和精采。

本論文能順利完成，首先要感謝指導老師余艇教授，兩年來不斷的指導研究方向，讓我受益良多。也感謝陳月枝教授和凌永健教授兩位口試委員，百忙中抽空審閱論文、給予寶貴的意見，使本論文能夠臻於完善。另外，也要感謝大學和研究所教導過我的老師，經由您們給予豐富的專業知識，奠定了我在科學知識的基礎。

同實驗室的淑慧學姊，你真的很照顧我們這些小毛頭，祝福你早日順利畢業。已經畢業的淑嫻學姊，感謝你在實驗上的指導還陪我一起熬夜作實驗、正在當兵的凱傑學長，真是越來越 man 了。在 433 一起奮鬥、吵鬧兩年的霆琪、士宗、阿暴、崧甫、培真(常客)，我們終於畢業啦~學妹鈺君，很多事情都麻煩你了。許家的大秉、小高、哈比人、阿川、振豪、芳銘、冷汗、阿嚕米等學長姊還有阿昆，感謝你們的幫忙。我的好友們，玟菱、蛋黃、呆蛋、陳曉、sandy、柏村、十字軍夥伴、慈青社夥伴等，因為你們的時常關心，在精神上給我很大的鼓勵。

最重要的家人，真的好愛你們啊!老爸總是很愛護我、給予人生的意見，老媽每天照顧我的胃、陪我聊天訴苦，老弟愛唱歌變魔術，笑果十足。也要感謝每天溫馨接送，一起分享生活的鼠保。有你們的陪伴，讓我知道自己很幸福。下一個人生階段，我會更努力的!

總目錄

中文摘要.....	II
英文摘要.....	IV
謝誌.....	VI
總目錄.....	VII
表目錄.....	XI
圖目錄.....	XII
第一章 緒論.....	1
1-1 前言.....	1
1-2 研究動機.....	2
第二章 研究背景與理論.....	4
2-1 離子液體介紹.....	4
2-1-1 離子液體的定義.....	4
2-1-2 離子液體的發展.....	6
2-1-3 離子液體的性質.....	7
2-1-4 離子液體的應用.....	9
2-2 蛋白質液相/液相萃取.....	11
2-2-1 蛋白質簡介.....	11
2-2-2 雙水相溶劑系統.....	12
2-2-3 反微胞萃取法.....	12

2-3 染料配體(dye-ligands)介紹.....	15
2-3-1 簡介.....	15
2-3-2 染料配體與蛋白質作用力研究.....	18
2-3-3 染料配體的應用.....	19
第三章 實驗部份.....	22
3-1 試藥.....	22
3-1-1 合成 [BMIM][PF ₆] 之藥品.....	22
3-1-2 合成 [BMIM] ₃ [CB3GA] 之藥品.....	22
3-1-3 配製緩衝溶液之試劑.....	23
3-1-4 蛋白質分子.....	24
3-2 儀器.....	25
3-3 實驗流程.....	26
3-3-1 離子液體之合成.....	26
3-3-1-1 合成[BMIM][PF ₆].....	26
3-3-1-2 合成 [BMIM] ₃ [CB3GA].....	28
3-3-2 製備液相/液相萃取系統.....	29
3-3-2-1 以親和性染料 CB3GA 為萃取劑.....	29
3-3-2-2 以親和性離子液體[BMIM] ₃ [CB3GA]做為萃取劑.....	29
3-3-3 配製緩衝溶液.....	30
3-3-4 萃取蛋白質溶菌酶.....	30

3-3-4-1 以親和性染料 CB3GA 為萃取劑.....	30
3-3-4-2 以親和性離子液體[BMIM] ₃ [CB3GA]做為萃取劑.....	31
3-3-4-2-1 改變[BMIM] ₃ [CB3GA]濃度對萃取率影響.....	31
3-3-4-2-2 攪拌時間對萃取率影響.....	31
3-3-4-2-3 改變 pH 值對萃取率影響.....	31
3-3-4-2-4 使用回收離子液體做萃取.....	32
3-3-4-2-5 濃縮蛋白質溶菌酶.....	33
3-3-4-2-6 溶菌酶活性測試.....	33
3-3-5 萃取其他蛋白質水溶液.....	34
3-3-5-1 萃取個別蛋白質水溶液.....	34
3-3-5-2 萃取混合蛋白質水溶液.....	34
3-3-6 蛋白質定量方式.....	35
3-3-6-1 利用 HPLC 定量蛋白質水溶液.....	36
第四章 結果與討論.....	37
4-1 離子液體之合成.....	37
4-2 製備液相/液相萃取系統.....	44
4-3 萃取蛋白質溶菌酶.....	46
4-3-1 改變[BMIM] ₃ [CB3GA]濃度對萃取率影響.....	47
4-3-2 攪拌時間對萃取率影響.....	48
4-3-3 改變 pH 值對萃取率影響.....	48

4-3-4 使用回收離子液體做萃取.....	52
4-3-5 濃縮蛋白質溶菌酶.....	54
4-3-6 溶菌酶活性測試.....	54
4-4 萃取其他蛋白質	56
4-4-1 分別萃取蛋白質水溶液.....	56
4-4-2 萃取混合蛋白質水溶液.....	59
第五章 結論.....	61
參考文獻.....	62



表目錄

第二章

表 2-1、不同種類氯化物之熔點4

表 2-2、咪唑鹽類的離子液體熔點8

表 2-3、染料分子在親和層析上的應用19

表 2-4、加入金屬離子後的染料分子對不同蛋白質之純化20

第四章

表 4-1、濃縮蛋白質溶菌酶54

表 4-2、蛋白質水溶液分別在不同 pH 值的萃取率58

表 4-3、混合蛋白質水溶液之萃取率60



圖目錄

第二章

圖 2-1、常見離子液體的陽離子	5
圖 2-2、離子液體合成步驟	5
圖 2-3、常見離子液體陰離子與水之互溶性趨勢	7
圖 2-4、離子液體在 70°C 作用力參數表示圖	9
圖 2-6、界面活性劑、微胞及反微胞示意圖	13
圖 2-7、Cibacron Blue F-3GA (CB3GA) 結構	16
圖 2-8、不同種類的染料配體結構示意圖	17

第三章

圖 3-1、[BMIM][PF ₆] 合成示意圖	27
圖 3-2、HPLC 儀器裝置圖	36

第四章

圖 4-1、[BMIM][PF ₆] 之 NMR 圖譜	39
圖 4-2、[BMIM][Cl] 之 NMR 圖譜	40
圖 4-3、[BMIM] ₃ [CB3GA] 之 NMR 圖譜	41
圖 4-4、[BMIM] ₃ [CB3GA] 之 Mass 圖譜	42
圖 4-5、[BMIM] ₃ [CB3GA] 之 DSC 圖譜	43
圖 4-6、[BMIM] ₃ [CB3GA] 之 UV-vis 圖譜	43

圖 4-7、萃取劑在 [BMIM][PF ₆] 中溶解狀況	44
圖 4-8、CB3GA 轉移到 [BMIM][PF ₆] 中之 UV-vis 圖	45
圖 4-9、蛋白質萃取過程示意圖	46
圖 4-10、不同萃取劑濃度對正向萃取率的影響	47
圖 4-11、反應時間對正向萃取率的影響	48
圖 4-12、pH 值對正向萃取率的影響	49
圖 4-13、溶菌酶在不同 pH 值表面所帶電荷數 ⁷⁷	50
圖 4-14、pH 值對反向萃取率的影響	51
圖 4-15、重複使用離子液體萃取次數和萃取率的關係圖	53
圖 4-16、溶菌酶水溶液 CD 光譜圖	55
圖 4-17、蛋白質水溶液 HPLC 層析圖	56



第一章 緒論

1-1 前言

隨著環保意識抬頭，綠色化學永續經營的概念逐漸被化學界重視。綠色化學是以減低或消除化學物質對環境的衝擊為目標，發展較安全的化學品或化學反應過程來取代危險物質的使用。工業上常利用液相／液相萃取分離化合物，一般是使用有機溶劑和水溶液或不互溶的兩種溶劑形成兩相，藉由欲分離的化合物在兩相之間的分佈不同，達到分離的目的。大部分的萃取過程需使用大量有毒、高揮發性、易燃的有機溶劑，在操作安全性上有許多考量及限制，大量的有機廢棄物對於環境亦會造成污染，使用過後需要依環保法規來處理這些化學廢棄物。因此，尋找降低對環境負擔的分離溶劑是迫切需要的課題。

室溫離子液體(room temperature ion liquids-RTILs)是一能取代傳統有機溶劑的物質，為陰陽離子組成的有機熔融鹽類，在室溫或接近室溫的溫度下為液體。可藉由改變其陽離子和陰離子的種類，控制它們的親水性、疏水性和黏度等性質，因其具有無毒、低熔點、低揮發性、不可燃性、可回收¹使用等特質，與有機溶劑相較之下，可降低實驗上的操作風險，因此離子液體被認為是一種新的「綠色溶劑」²。近年來有關離子液體的研究和應用文獻急速增加，在化學方面已將之

應用在分離科學³、有機合成^{4,5,6}、催化反應^{4,5,7}以及電化學⁸等領域。隨著離子液體的研究發展，其應用將更深入、更廣泛，使其在綠色化學的重要性相對增加。

蛋白質在生物體內扮演重要的角色，溶菌酶(lysozyme)是一種可溶解細菌細胞壁的酵素，廣泛存於生物中，包括動物的淚水、口水及人乳、雞蛋蛋白等。其中以雞蛋蛋白中的溶菌酶與人體內的溶菌酶具有相似的性質，也是自然界溶菌酶含量最多的。液相／液相萃取應用在純化蛋白質方面，已發展出的有雙水相系統⁹以及利用反微胞法^{10,11}萃取蛋白質。



1-2 研究動機

離子液體應用在蛋白質的液相/液相萃取研究中，已發現在帶有羥基(hydroxyl-group)的有機陽離子、疏水性陰離子的離子液體中添加皇冠醚類(crown ethers)，可將蛋白質細胞色素c(cytochrome c)從水溶液中萃取到離子液體層¹²，隨著離子液體層中的含水量增加，蛋白質萃取率也明顯增加。本實驗室也曾利用離子液體 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([BMIM][PF₆])當作萃取劑¹³，[BMIM][PF₆]加入乙酸乙酯(ethyl acetate)之後和水可形成兩相系統，利用調控pH值，改變蛋白質表面所帶電荷，藉由離子液體的陰離子和蛋白質間的靜電吸引力達到萃取目的。但此實驗必須在強

酸條件之下才有好的萃取效果，對蛋白質活性可能會造成影響。

由於親和性染料Cibacron Blue F-3GA (CB3GA)和蛋白質溶菌酶(lysozyme)之間具有親和作用力¹⁴，能提高在萃取蛋白質上的選擇性。因此本實驗將CB3GA合成為離子液體[BMIM]₃[CB3GA]當作萃取劑，將[BMIM]₃[CB3GA]溶於離子液體[BMIM][PF₆]中，和蛋白質水溶液形成兩相，利用液相/液相萃取將蛋白質萃取到離子液體相中，因所使用的萃取相為離子液體，可回收重複萃取，取代傳統有機溶劑，達到安全、環保之目的。




第二章 研究背景與理論

2-1 離子液體介紹

2-1-1 離子液體的定義

離子液體是由陽離子和陰離子組成的熔融鹽類，和無機鹽類(如氯化鈉)所不同的是離子液體的陽離子為有機離子，熔點和無機鹽類差異非常大¹⁵，如表2-1⁵，一般將熔點低於100°C的融鹽稱為離子液體(room temperature ion liquids, ILs)。

表 2-1、不同種類氯化物之熔點⁵

Salt	M.p. [°C]
NaCl	803
KCl	772
 Cl ⁻	R=R'=methyl ([MMIM]Cl) ^[a] 125
	R=methyl, R'=ethyl ([EMIM]Cl) 87
	R=methyl, R'=n-butyl ([BMIM]Cl) 65

[a] MMIM=1,3-dimethylimidazolium

離子液體可經由特定陽離子和陰離子，透過不同組合方式可高達 10^{18} 種，常見陽離子如圖2-1⁵，這些陽離子除了本身碳鏈長短可任意改變，例如陽離子1-alkyl-3-methylimidazolium ([C_nMIM]⁺, n為線性烷基碳的數目)，還可和不同的有機或無機的陰離子形成種類廣泛的離子液體，因此離子液體又被稱作是「可設計合成的溶劑」(designer

solvent)。一般常見的離子液體陰離子有hexafluorophosphate(PF_6^-)、tetrafluoroborate(BF_4^-)、bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]amide $[(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}]^-$ 、ethanoate(CH_3CO_2^-)、trifluoroethanoate(CF_3CO_2^-)、trifluoromethylsulfonate(CF_3SO_3^-)、及halide(Br^- , Cl^- , I^-)。不同形式的離子液體在物性和化性上有相當大的差異，其基本的合成實驗流程如圖 2-2⁵。

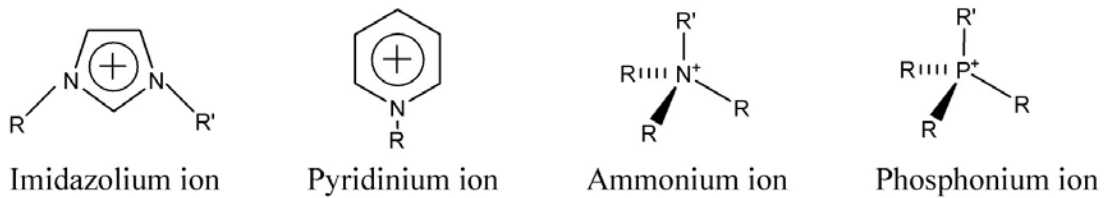


圖 2-1、常見離子液體的陽離子⁵

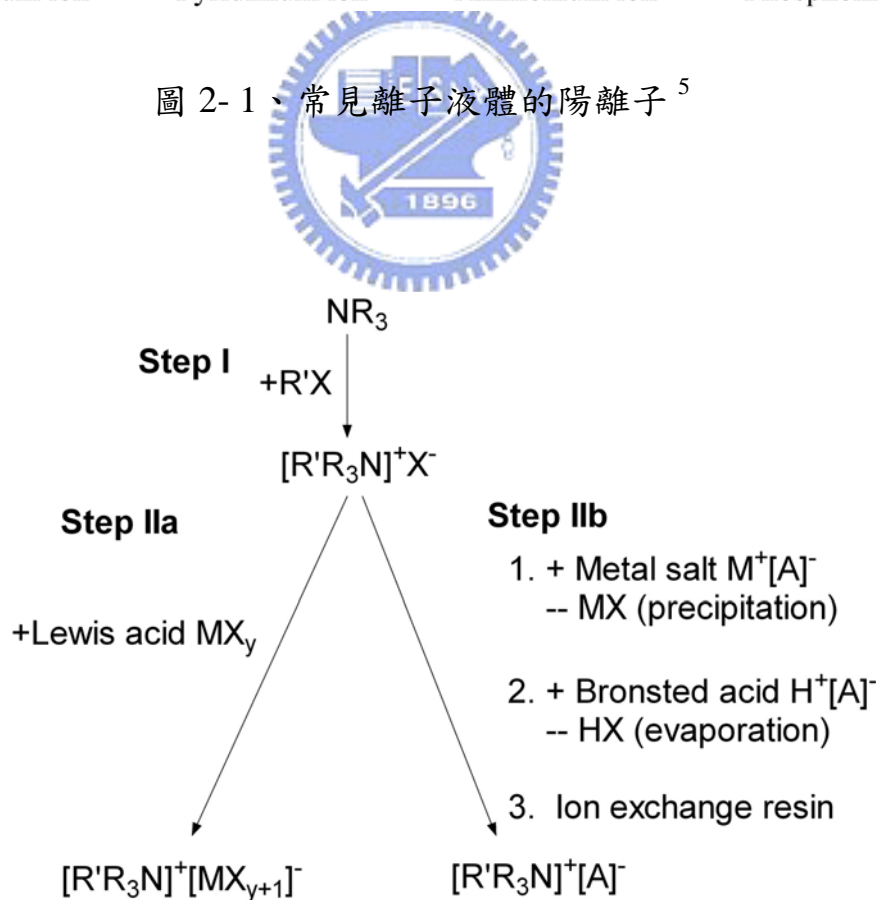


圖 2-2、離子液體合成步驟⁵

2-1-2 離子液體的發展

數十年來離子液體的相關文獻逐年快速成長，其發展最早是在 1914 年，ethylammonium nitrate ($[\text{EtNH}_3]\text{NO}_3$) 低溫時以離子態液體呈現而被報導出來，接著在 1951 年時 Hurley 發展出有機鋁離子液體 *N*-ethylpyridinium bromide- aluminium chloride ($[\text{EtPy}]\text{Br}\text{-AlCl}_3$)，並拿來作為電鍍鋁的浸漬液¹⁶。隨後一直到 1970 年代 Osteryoung 和 Wilkes 才成功製備出一系列氯化鋁陰離子的融鹽(chloroaluminate melts)¹⁷，從此離子液體被大量的應用在電化學。1992 年，Wilkes 研究團隊將 AgBF_4 加入 $[\text{EMIM}][\text{I}]$ 反應後，發展出離子液體 $[\text{EMIM}][\text{BF}_4]$ ¹⁸，這種離子液體在水及空氣中都相當安定，使得咪唑(imidazolium)類的陽離子所組成的離子液體在應用方面引起重視¹⁹，往後所發展的離子液體皆以此種類為主。

近年來，一些具有特殊功能性的離子液體也陸續被合成出來，例如：含 DNA 離子液體²⁰ 以及利用胺基酸作為陰離子的離子液體等等²¹。另外，日本東京大學賓口宏夫教授在實驗中發現帶有金屬磁性的離子液體²²，他們推測此種物質為非液體亦非固體的狀態，若進一步得到證實，此種新物質狀態可能推翻一般所認為的物質三態。

2-1-3 離子液體的性質

離子液體具有低熔點、極低蒸氣壓、不可燃性、寬的電化學窗口 (potential window)、良好的導電與導熱性、選擇性溶解力和可設計性等特殊性質，使得離子液體應用範圍非常廣泛。

離子液體之特性會隨著陽離子和陰離子形式而有所不同，例如在親水性方面，[BMIM][Cl]這種離子液體和水是互溶的，若將陰離子置換成[PF₆]⁻，形成的離子液體[BMIM][PF₆]則和水不互溶。圖2-3表示常見離子液體之陰離子對其在水中溶解度的影響²³，而研究也發現陽離子上的烷基碳鏈越長會造成離子液體疏水性越強^{24,25}。

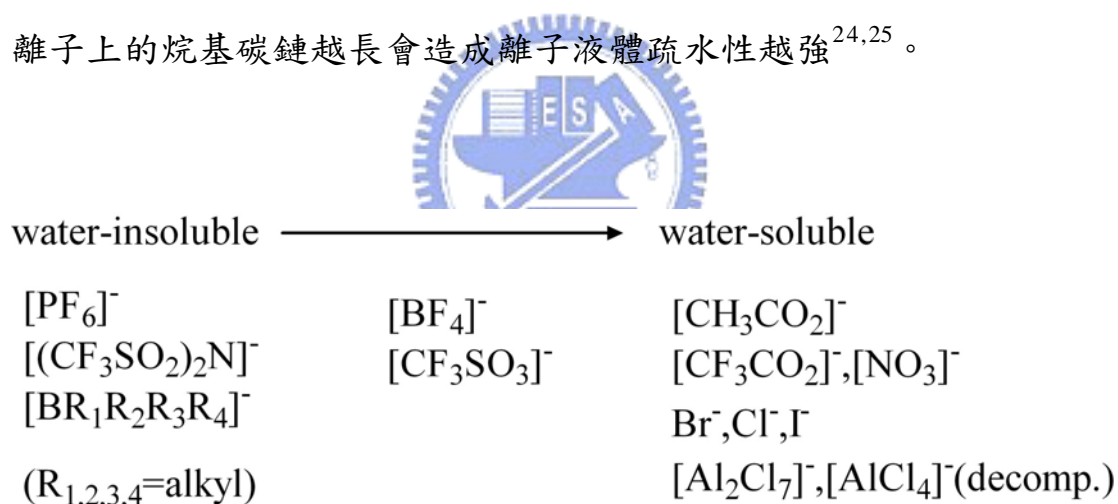


圖 2-3、常見離子液體陰離子與水之互溶性趨勢¹⁵

由於陽離子和陰離子之間的作用力，使得離子液體黏度比一般有機溶劑大很多，其黏度大小受到分子之間氫鍵和凡得瓦耳力強弱的影響，作用力越強則黏度越大，一般來說，陽離子上碳鏈越長則凡得瓦耳力越大，造成黏度越大。在陽離子相同情況下，不同陰離子的離

子液體其黏度順序如下 $\text{Cl}^- > \text{PF}_6^- > \text{BF}_4^- > \text{NO}_3^- > (\text{CF}_3\text{SO}_3)_2\text{N}^-$ ²⁴。離子液體的密度範圍則在 1.0 到 1.6 g/cm³ 之間，陽離子團越大，密度相對減小⁵，而溫度越高密度越低。

離子液體的熔點在應用上來說是重要的參考指標，其熔點決定於陽離子的對稱性，對稱性差會影響晶體的排列，造成熔點下降，分子間若有氫鍵作用力則會使熔點增高。另外，陰離子的種類不同也會影響熔點。常用咪唑鹽類(imidazolium)的離子液體熔點，如表 2-2⁷。

表 2-2、咪唑鹽類的離子液體熔點⁷

R	X	mp [°C]
Me	Cl	125
Et	Cl	87
n-Bu	Cl	65
Et	NO ₃	38
Et	AlCl ₄	7
Et	BF ₄	6
Et	CF ₃ SO ₃	-9
Et	(CF ₃ SO ₃) ₂ N	-3
Et	CF ₃ CO ₂	-14
n-Bu	CF ₃ SO ₃	16

2-1-4 離子液體的應用

近幾年來離子液體的應用相當廣泛，已有回顧文獻針對分析化學方面做介紹^{23,26,27}，應用範圍包括液相/液相萃取、氣相層析、質譜儀雷射脫附基質及電化學等等。Abraham 提出的“溶劑化參數模型”(solvation parameter model)²⁸，被用來表示離子液體和溶質之間的作用力，根據參數不同，離子液體所應用的領域也有所差異，如圖 2-4。

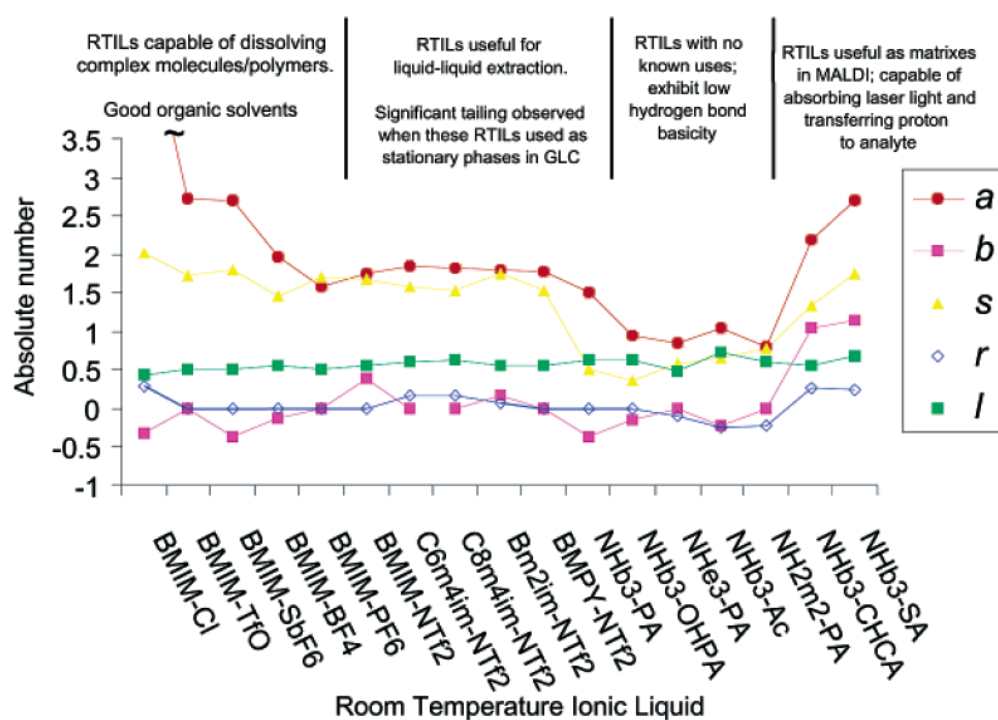


圖 2-4、離子液體在 70°C 作用力參數表示圖²⁸

a: 氫鍵鹼度 (hydrogen-bond basicity), *b*: 氫鍵酸度 (hydrogen-bond acidity), *s*: 偶極性 (dipolarity) or 極化性 (polarizability), *r*: 離子液體和溶質 π 電子和非鍵結電子之間作用的能力, *l*: 分散力 (dispersion forces)。

因離子液體可調整成親水性或疏水性，在液相/液相萃取佔有很大優勢。在離子液體中加入冠醚類(crown ether)分子作為萃取劑，萃取硝酸鋇²⁹、重金屬離子³⁰、胺基酸³¹以及蛋白質^{12,32}；也有研究直接在陽離子上修飾上硫醚、硫脲等官能基³³，此方法不須加入額外萃取劑即可萃取 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} ，這樣的離子液體又稱為 task-specific ILs。用離子液體當介質，可將奈米金和奈米棒從水相轉移到離子液體相³⁴，藉由調整 pH 值，某些染料也有相轉移的現象^{35,36}。也有利用離子液體及二氧化碳萃取有毒的多環芳香族後，再回收離子液體的環保分離方法³⁷。

在氣相層析管柱中，離子液體因高黏度、無揮發性且在高溫穩定，使其可填充當作靜相，對化合物亦有多種作用力³⁸，若為極性高離子液體可用來分離極性樣品，反之，則可用來分離非極性樣品³⁹。在電化學領域，電位窗(potential window)主要決定於溶劑本身是否容易被還原或氧化，離子液體和水比有較寬廣的電位窗(potential window)及導電度，例如 $[\text{C}_3\text{H}_7(\text{CH}_3)_3\text{N}][(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}]$ 電位窗可達 5.7 V⁸。離子液體也可以作為質譜儀雷射脫附基質，Armstrong 等人曾用蛋白質、胜肽及 PEG-2000 作為分析物證實其可能性⁴⁰。也曾被用來偵測 DNA oligomer⁴¹。離子液體的應用已是綠色化學的一部分，各領域也陸續投入離子液體的研究，其未來發展性指日可待。

2-2 蛋白質液相/液相萃取

一般蛋白質液相/液相萃取有兩個步驟，正向萃取(forward extraction)與反向萃取(backward extraction)。正向萃取是將蛋白質從水相萃取到有機相或另一水相中;移除原來蛋白質所在的水相後，添加新的水溶液，將蛋白質再萃回到此新的水相稱為反向萃取。

2-2-1 蛋白質簡介

蛋白質是由超過50個胺基酸所形成的多胜肽鏈(polypeptide chain)，經雙硫鍵與非共價鍵的作用力結合，形成立體結構，在生物體內扮演著非常重要的角色。本論文所使用的溶菌酶(lysozyme)是一種可溶解細菌細胞壁的酵素，在哺乳類動物的血液、眼淚和乳汁中皆存在，亦分佈於鳥類和植物當中，其中以鳥類的卵中含量最多。雞蛋中的溶菌酶含量約佔3~4%，且和人體內溶菌酶性質相似，不僅有抗菌性亦有抗病毒之作用因此較受重視，亦可用來替代化學保存劑做為食品中的天然抗菌劑。本實驗使用的即是雞蛋白溶菌酶(hen-egg white lysozyme)，由129個胺基酸分子所構成，分子量約為14.4 kDa，等電點(isoelectric point, pI)為10.7，有四條雙硫鍵位置分別排列在Cys6-Cys127、Cys30-Cys115、Cys64-Cys80、Cys76-Cys94。

隨著生物科技進步，蛋白質的分離和純化日益受到重視。傳統上在分離蛋白質常用過濾、鹽析、凝膠電泳或各種層析(chromatography)

等技術進行樣品分離，但這些方法只能處理少量樣品。之後發展出的雙水相溶劑系統(aqueous two phase solvent system) 及反微胞萃取法(reversed micelle extraction)，可用來萃取大量的生物樣品。

2-2-2 雙水相溶劑系統

雙水相溶劑系統是瑞典的 Albertson 於 1958 年所提出⁴²，因所需成本低、操作簡單而被人們重視。所謂的雙水相溶劑系統是將兩種物化性質相異之高分子聚合物(polymer)或一種高分子與一種鹽類(salt)，加入水溶液中，這些不同性質的大分子分別與水分子產生交互作用力而成兩相。藉由欲分離物化合物性質差異，與兩水相分子間有不同作用力而產生分配(partition)行為達到純化分離的效果。化合物分子在兩相的分配情形受許多因素所影響，主要包括高分子聚合物種類⁴³、緩衝液濃度^{44,45}、溫度⁴⁴及溶液酸鹼值⁴⁵等。由於分離步驟少、操作條件溫和、生物分子活性保存佳，且不需使用有機溶劑，目前雙水相溶劑系統已被應用在蛋白質、核酸等生物分子的萃取分離及純化上⁴³。也曾在逆流層析儀(countercurrent chromatography)中使用，進行蛋白質的製備分離^{46,47}。

2-2-3 反微胞萃取法

微包(micelles)由界面活性劑在水溶液中的濃度大於臨界微胞濃度(critical micelle concentration,CMC)聚集而成，疏水基團朝內，親水

基團朝外，形成一個團狀的結構，如下圖 2-5。相反地，反微胞(reverse micelles)則是界面活性劑溶於有機溶劑，疏水基向外，親水基團朝內可包圍水分子，形成水核(water pool)，一般反微胞萃取就是利用此水核將水溶液中極性大的分子轉移到有機相中。

反微胞系統萃取的機制包含靜電作用力(electrostatic interactions)和疏水作用力(hydrophobic interactions)。若使用離子型的界面活性劑，反微胞則會帶電荷，若水溶液中的分子帶有相反電荷就會被吸引到有機相;相對的若水溶液中的分子帶有和界面活性劑相同電荷，則會產生排斥而回到水相⁴⁸。對非離子型的界面活性劑來說，靜電作用力影響便不大，一般認為是水溶性分子疏水基部分和界面活性劑上的疏水基之間產生凡得瓦耳作用力，而達到萃取目的^{49,50}。

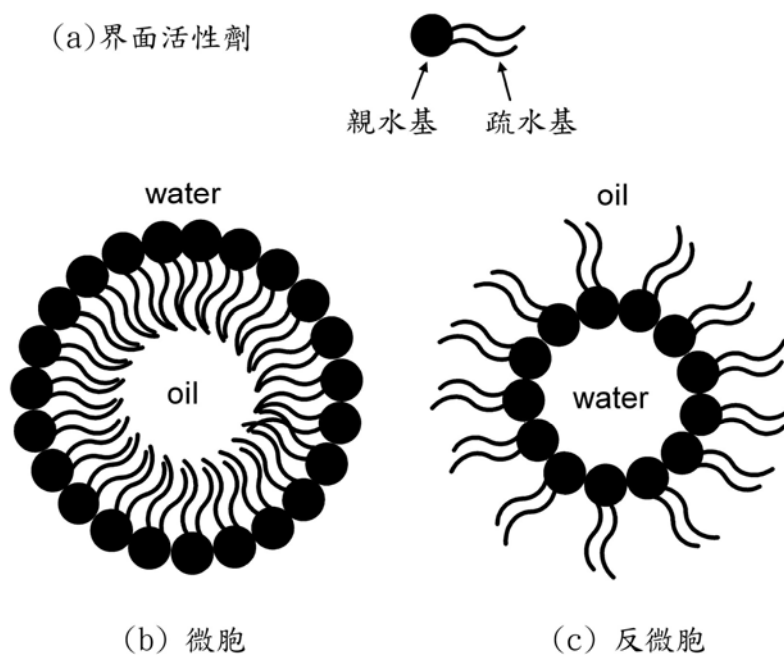


圖 2-5、界面活性劑、微胞及反微胞示意圖

反微胞法萃取蛋白質的效率會受到系統狀態而有所影響，例如界面活性劑的選擇、溶液 pH 值、離子種類、離子強度及溫度等。離子型的界面活性劑與蛋白質之間有強的靜電吸引力，因此 pH 值對萃取效果來說是重要因素，影響著蛋白質表面的電荷分佈 (charge distribution over the protein surface)，當 pH 值大於蛋白質的等電點 ($\text{pH} > \text{pI}$)，蛋白質的表面淨電荷為負，使用陽離子界面活性劑時，就需要使蛋白質帶負⁵¹；相反地，使用陰離子界面活性劑時，水溶液 pH 就需要小於蛋白質等電點 ($\text{pH} < \text{pI}$)⁵²。但在 pH 調控範圍上有限制性，因為蛋白質處於過酸或過鹼條件下，會造成其變性或喪失活性，使得萃取效果不佳⁵³。而非離子界面活性劑因靜電作用力弱，較不受 pH 值影響，對蛋白質傷害也比較小⁵⁴，因此適合用在生物分子上。

水溶液中離子的濃度和種類亦是影響反微胞萃取蛋白質的因素，若水溶液中的鹽類濃度小於某值，便無法構成反微胞，水相和有機相會產生一穩定的乳化態 (microemulsion) 而無法分層。過去有文獻發表⁵⁵，水溶液中的離子濃度小於 0.1 M 時，就會形成乳化態，不易恢復澄清，對於蛋白質萃取無法達到好的效率，所以一般反微胞系統需加入鹽類來造成穩定的分層。

當水溶液中離子濃度增加時，蛋白質表面和界面活性劑親水基之間的靜電吸引力會受到干擾，稱之為遮蔽效應 (Debye screening effect)。不同離子種類所造成的影響亦有所差異，離子所帶電荷數越

多，遮蔽效應越大，若電荷數相同，則隨著離子半徑增加，遮蔽效應越明顯。已有研究指出離子種類對蛋白質萃取率的影響為 $K^+ < Rb^+ < Cs^+ < Na^+ < Li^+$ ，當溶液中加入鉀離子遮蔽效應大，萃取效果最差⁵⁶。且鹽類濃度增高時，因陽離子型界面活性劑親水基之間的排斥力下降，會造成反微胞的水核變小，相對的蛋白質溶解力就下降。因此，在反微胞系統中，鹽類濃度過高或過低都不利於蛋白質的萃取，必須控制在一定範圍內，方能有良好的萃取效果。

2-3 染料配體(dye-ligands)介紹

2-3-1 簡介



在純化蛋白質的方法中親和作用力是常被利用的一種方式，所謂的親和作用力是指生物分子和其配體(ligand)之間形成專一性結合，並且為可逆反應，例如抗體和抗原、酵素和其受質(substrate)、酶和酶的抑制劑等等。親和層析(affinity chromatography)就是根據這種親和力發展出來的純化方法，原理是將配體連接到層析管柱的填充材質上，再進行蛋白質的吸附與脫附達到分離純化作用⁵⁷。

上面所提到的天然生物配體需經過複雜純化步驟、不穩定、價格昂貴且不易固定於親和管柱上，染料配體則可以克服這些缺點，其合成容易，成本也較低，尤其是其活性部位可輕易和管柱填充物反應而

固定於管柱上，因此常用來取代天然配體純化生物分子。這種染料原來是用在紡織業上的染色，和棉質布料間可形成共價鍵，因意外發現 blue dextran和特定的激酶(kinase)之間會產生作用力結合⁵⁸。在1972年，Roschlau和Hess首次將Cibacron Blue這種藍色染料利用共價鍵固定到層析管柱中的Sephadex G-200上，純化yeast pyruvate kinase⁵⁹。自此之後這樣的觀念便廣泛的使用在蛋白質純化上。

染料配體基本結構包含三個部分:1.發光團(chromophore)，通常是 anthroquinone、azo或phthalocyanine等。2.活性基團(reactive group)，通常以trichloro-s-triazine為基礎，上面所帶的氯可和管柱上帶有羥基(hydroxyl-group, -OH)的填充物反應形成共價鍵結。3.架橋(bridge)，用來連接上述兩個部分。常見具活性的染料配體種類如下頁圖2-7⁶⁰。本實驗所選擇的是已被廣泛使用的Cibacron Blue F-3GA(CB3GA)，又稱為Procion Blue H-B，其結構如圖2-6。

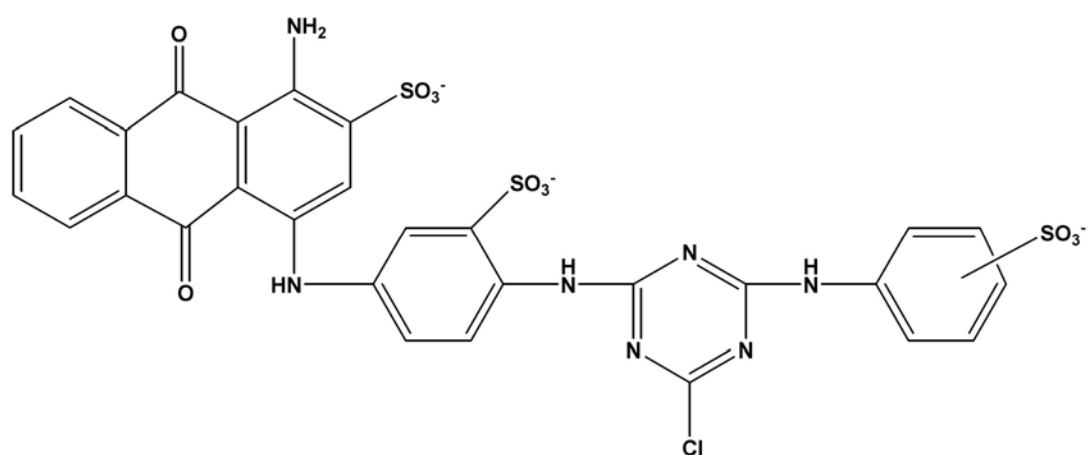


圖 2- 6、Cibacron Blue F-3GA (CB3GA)結構

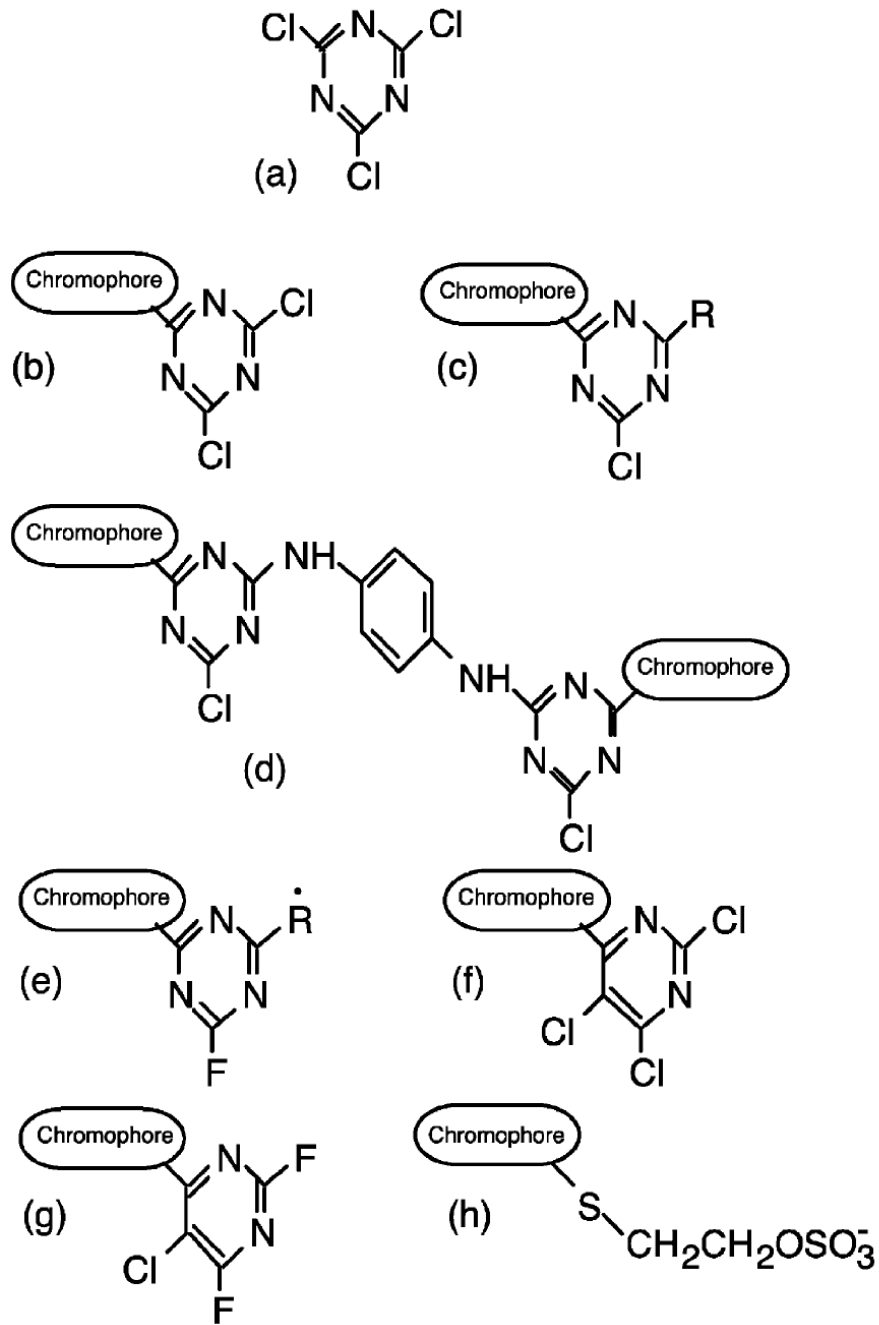


圖 2-7、不同種類的染料配體結構示意圖⁶⁰

- (a) cyanuric chloride, (b) Procion MX series, (c) Cibacron and Procion H,
 (d) Procion H-E, (e) Monofluorotriazinyl, Cibacron, Ciba-Geigy
 (f) Trichloropyrimidnyl, (g) Difluorochloro-pyrimidnyl,
 (h) Sulfatoethyl sulfone.

2-3-2 染料配體與蛋白質作用力研究

關於染料配體和蛋白質之間作用力的研究探討，在1979年以x-ray研究CB3GA和horse liver alcohol dehydrogenase複合物的晶體⁶¹，接著陸續解出CB3GA-NAD(P)H:quinone reductase⁶²和CB3GA-glutathione S-transferase⁶³的複合物結構。其中CB3GA-NAD(P)H:quinone reductase複合物指出CB3GA與quinone reductase之間作用力和NADP⁺上的AMP與此酵素作用非常類似。另外在CB3GA-glutathione S-transferase複合物中則發現CB3GA的發光團和胺基酸之間存有凡得瓦耳力和氫鍵作用力。



近年來，基質輔助雷射脫附質譜法(matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, MALDI MS)也應用在染料-蛋白質作用力的研究^{64,65}。結果顯示CB3GA上的磺酸基(sulfonic acid group, -SO₃⁻)偏好和精胺酸(arginine)這種胺基酸作用，較不易和其他胺基酸作用。精胺酸是所有胺基酸中pKa值最高，而染料上的磺酸基pKa值低於零，在pH1~14都帶負電。由於大部分的染料配體上都帶有磺酸基，因此推測精氨酸-磺酸基(arginine-sulfonate)這種特定的靜電作用力能促進染料和蛋白質的結合。靜電吸引力也在此被歸為染料-蛋白質作用力主要因素，蛋白質疏水性和氫鍵作用力則為次要因素。

綜合來說，染料和蛋白質之間的作用力包括:染料分子結構類似

生物配體，便可和特定蛋白質的活性部位專一性結合;但某些條件下幾乎所有的蛋白質都會被吸附到染料配體上，此時蛋白質和染料之間便是利用靜電吸引力、疏水性、氫鍵作用力以及電荷轉移作結合。

2-3-3 染料配體的應用

染料配體最早被應用在親和層析^{66,67}，不同的染料分子可用來純化不同的蛋白質，如表 2-3 所示⁶⁸。

表 2-3、染料分子在親和層析上的應用⁶⁸

Enzyme	Dye
Glycerol kinase	Procion Blue MX-3G
Glucose kinase	Procion Brown H-3R
Glycerol dehydrogenase	Procion Red HE-3B
3-Hydroxybutyrate dehydrogenase	Procion Red H-3B
Malate dehydrogenase	Procion Blue MX-4GD
Tryptophanyl tRNA synthetase	Procion Brown MX-5BR
Human serum albumin	Procion Blue HB
Carboxypetidase G ₂	Procion Red H-8BN

也有研究利用金屬離子螯合在染料配體上幫助吸附蛋白質，利用蛋白質表面給予電子能力較強的胺基酸殘基，如 histidine 上的

imidazole group、cysteine 上的 thiol group 以及 tryptophan 上的 indoyl group，和金屬離子之間有較強的作用力，加入金屬離子可增加在蛋白質的選擇性，相關研究如表 2-4⁶⁰。

表 2-4、金屬離子後對不同蛋白質之純化⁶⁰

Protein	Promoting metal ion	Dye
Carboxypeptidase G ₂	Zn ²⁺	Procion Red H-8BN
Alkaline phosphatase	Zn ²⁺	Procion Yellow H-A
Hexokinase	Mg ²⁺	Procion Green H-4G
Tyrosinase dehydrogenase	Cu ²⁺	Procion Blue HE-RD
Ovalbumin	Al ³⁺	Cibacron Blue F3GA
Catalase	Fe ³⁺	Cibacron Blue F3GA
Albumin	Fe ³⁺	Congo Red
	Cu ²⁺	Congo Red
	Zn ²⁺	Cibacron Blue F3GA
Glucose oxidase	Fe ³⁺	Cibacron Blue F3GA
Lysozyme	Cu ²⁺	Cibacron Blue F3GA

CB3GA 已用來純化多種類的蛋白質，包含激酶(kinase)、脫氫酶(dehydrogenase)、血清蛋白等等，除了在親和性層析上的應用⁶⁹，近年來也被用於固定在磁性粒子⁷⁰及親和性薄膜⁷¹上，以吸附蛋白質溶菌酶。也有將CB3GA合成在熱敏高分子(thermo-sensitive polymer)的支鏈上⁷²，利用熱敏高分子超過低溫臨界溶液溫度(lower critical solution temperature, LCST)時產生沉澱，從雞蛋蛋白中萃取溶菌酶。

在液相/液相萃取方面，有研究藉由帶有羥基(-OH)的界面活性劑和CB3GA反應，形成具有親和力的反微胞，應用在反微胞萃取法分離蛋白質⁷³。染料配體價格便宜且穩定，因此已許多研究將其固定在不同材料純化不同蛋白質。



第三章 實驗部份

3-1 試藥

3-1-1 合成 [BMIM][PF₆] 之藥品

- (1) 1-chlorobutane, C₄H₉Cl, 99 %, GR grade (Janssen Chimica, Geel, Belgium)
- (2) 1-methylimidazole, C₄H₆N₂, 99 %, GR grade (Acros, Geel, Belgium)
- (3) Potassium hexafluorophosphate, KPF₆, 99 %, GR grade (Showa, Tokyo, Japan)
- (4) Magnesium sulfate anhydrous, MgSO₄, 99 %, GR grade (Showa, Tokyo, Japan)
- (5) Ethyl Acetate, CH₃COOC₂H₅, HPLC grade (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, USA)



3-1-2 合成 [BMIM]₃[CB3GA] 之藥品

- (1) Cibacron Blue F-3GA , C₂₉H₁₇ClN₇Na₃O₁₁S₃, GR grade (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- (2) Silver nitrate, AgNO₃, GR grade, 99.8 % (Showa, Tokyo, Japan)
- (3) 1-butyl-3-methyl imidazolium chloride, [BMIM][Cl], GR grade

(Acros, Geel, Belgium)

(4) Acetone Nitrile, HPLC grade, 99.9 % (TEDIA, Fairfield, OH, USA)

(5) Menthol, CH₃OH, HPLC grade, 99.9 % (TEDIA, Fairfield, OH, USA)

(6) Acetone, CH₃COCH₃, HPLC grade, 99.9 % (TEDIA, Fairfield, OH, USA)

3-1-3 配製緩衝溶液之試劑

(1) Hydrochloric Acid, HCl, GR grade (Showa, Tokyo, Japan)

(2) Potassium chloride, KCl, GR grade (Riedel-de Haën, Seelze, Germany)

(3) Sodium chloride, NaCl, GR grade (Riedel-de Haën, Seelze, Germany)

(4) Glycine, C₂H₅NO₂, GR grade (Riedel-de Haën, Seelze, Germany)

(5) Acetic Acid, CH₃COOH, HPLC grade (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, USA)

(6) Sodium acetate, CH₃COONa, 98.5 %, GR grade (Showa, Tokyo, Japan)

(7) Sodium dihydrogenphosphate anhydrous, NaH₂PO₄, 98.0 %, GR grade (Showa, Tokyo, Japan)

(8) Potassium dihydrogenphosphate, KH₂PO₄, 99%, GR grade (Showa, Tokyo, Japan)

- (9) Tris(hydroxymethyl) aminomethane, $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$, ACS grade
(TEDIA, Fairfield, OH, USA)
- (10) Sodium hydrogen carbonate, NaHCO_3 , 99.5 %, GR grade (Showa,
Tokyo, Japan)
- (11) Sodium hydroxide, NaOH , 96 %, GR grade (Showa, Tokyo, Japan)
- (12) D.I.W.去離子水，經由 Millipore (Bedford MA ,USA)的 Milli-Q
plus 處理

3-1-4 蛋白質分子

- (1) Cytochrome c (細胞色素 c) from Horse Heart , M.W. : 12361, 97% ,
pI : 10.5 , (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- (2) Lysozyme (溶菌酶) from chicken egg white , M.W. : 14307 , 97% ,
pI : 10.7 , (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- (3) Ovalbumin (卵白蛋白) from chicken egg white , M.W. : 44287 ,
98% , pI : 4.5 , (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- (4) Bovine serum albumin (牛血清蛋白) , 簡稱 BSA , M.W. : 63000 ,
98% , pI : 4.6 , (Sigma, St. Louis, MO, USA)

3-2 儀器

(1)核磁共振儀(Nuclear Magnetic Resonance, NMR): DRX-300, (Bruker, Germany); Uniytinova-500, (Varian, USA)

(2)紫外光-可見光光譜儀(UV-Visible Spectrophotometer): Hewlett Packard 8453, (Waldronn, Germany)

(3)高效能液相層析管柱(reversed-phase HPLC column): Vercopak Inertsil 7 octadecyl silica-3 (ODS-3), (建宏層析, 台北)
管柱尺寸為 4.6×250 mm, 孔徑大小為 10 μm, 用於蛋白質的分析與定量⁷⁴。

(4)梯度幫浦(Gradient Pump): Degasys DG 2410, (Lab Alliance, USA)
結合 Series III pump, 最多可做四種動相組成的梯度混合。

(5)離心機(Centrifuges): EBA20, (Hettich, Germany)
最大轉速 6000 rpm, 最大離心力為 3421 g (轉速單位 $g=11.18 \times R \times \text{rpm}^2 \times 10^{-6}$, R:旋轉軸半徑(單位 cm))。

(6)質譜儀(Mass Spectroscopy): Quattro Micro, (Waters, USA)

(7)熱重量分析儀(Thermogravimetric analysis, TGA):
使用 Du Pont Instrument TGA2950 儀器。

(8)微差掃描卡計(Differential Scanning Calorimetry, DSC):
使用 SEIKO EXSTAR 6000DSC 及 Computer/Thermal Analyzer。測量方式為:取 5~10 mg 的樣品裝入鋁製的 cell 中,在通入氮氣為 100 ml/min 下,做兩階段式 DSC 測試:

1. 降溫速率 10°C/min, 範圍 30°C~-70°C
2. 升溫速率 10°C/min, 範圍-70°C~30°C

重複此步驟三次,可經由圖譜判斷離子液體的熔點。

(9)圓形二相色性分光光譜儀 Circular Dichroism (CD) Spectrometer,
Aviv Model 62ADS (Lakewood, N.J.)

3-3 實驗流程

3-3-1 離子液體之合成

本實驗使用的離子液體包含[BMIM][PF₆]、[BMIM]₃[CB3GA]。其中[BMIM][PF₆]為疏水性離子液體，容易和水溶液分層，因此實驗中將其作為萃取相，其合成步驟參考相關文獻⁷⁵。另外，[BMIM]₃[CB3GA]則是將對蛋白質具有親和性的染料 CB3GA，和離子液體的陽離子[BMIM]⁺結合，使其帶有離子液體特性，並同時兼具親和性的性質，在本實驗中作為萃取蛋白質的萃取劑。以下為離子液體的合成步驟。

3-3-1-1 合成[BMIM][PF₆]

1.將 0.6 mole (62.7 ml) 1-chlorobutane 和 0.6 mole (47.8 ml)

1-methylimidazole 加入至 250 ml 圓底瓶中，並架設迴流裝置，加熱至 80°C 後，持續攪拌約 48 hr，可得到一金黃色黏稠液體

1-butyl-3-methylimidazolium chloride ([BMIM][Cl])。

2.將此黏稠液體到入分液漏斗中，加入 50 ml 的乙酸乙酯洗去未反應物，並取出下層液於圓底瓶中。

3. 下層液加熱至 90°C 攪拌一天，去除乙酸乙酯。
4. 取 0.6 mole KPF_6 ，加入 300 ml 去離子水，室溫下攪拌至溶解。
5. 將 $[\text{BMIM}][\text{Cl}]$ 加入 KPF_6 水溶液中，攪拌約 1 hr。
6. 將溶液倒入分液漏斗中，取出水層，再加入少許去離子水，除去水層，重覆此步驟數次直到水層成中性。
7. 取出下層離子液體，加入硫酸鎂除去離子液體層中的水，經重力過濾後，即可得到 1-butyl-3-methyl imidazolium hexafluorophosphate ($[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$)。
8. 合成示意圖如圖 3-1，最後將產物測 $^1\text{H-NMR}$ ，以鑑定之。

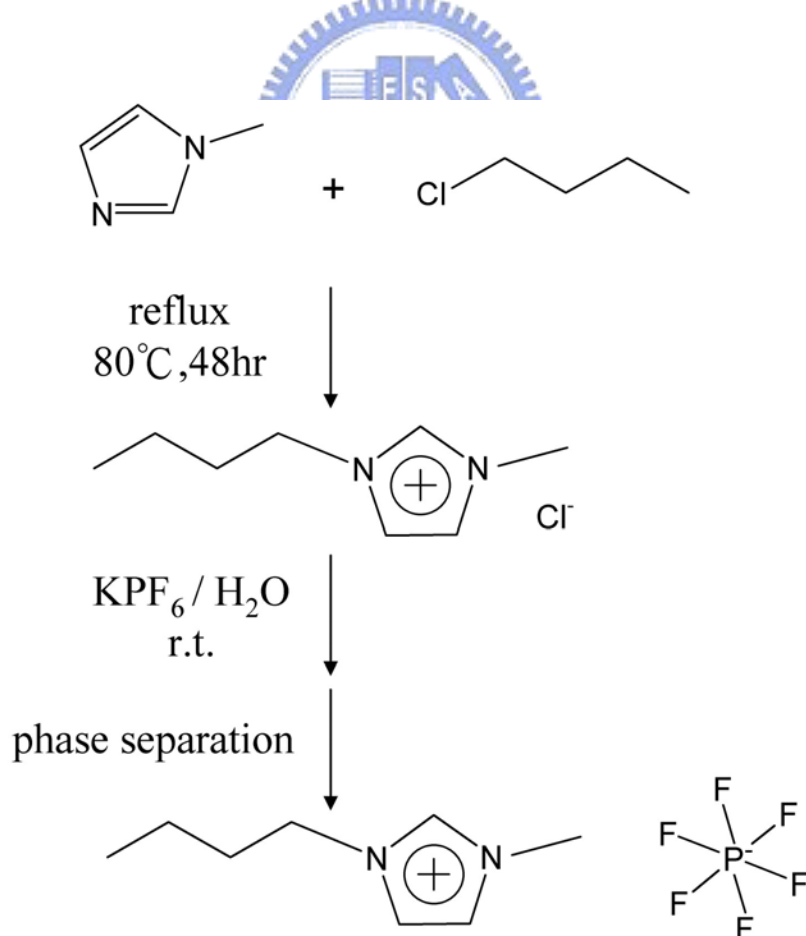
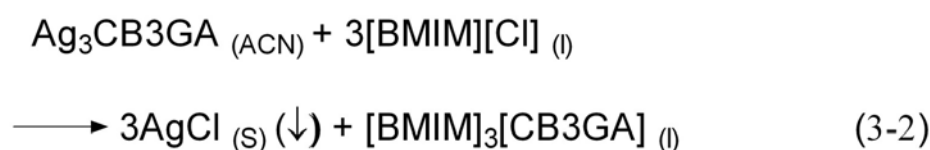
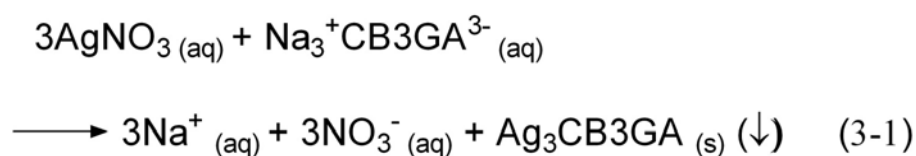


圖 3-1、 $[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$ 合成示意圖

3-3-1-2 合成 [BMIM]₃[CB3GA]

1. 取 2×10^{-3} mole (1.68 g) Cibacron Blue F3GA (CB3GA)，溶於 50 ml 去離子水，再加入 2×10^{-2} mole (3.39 g) AgNO₃，室溫下攪拌 24 hr。
2. 將所得溶液以 6000 rpm 轉速離心 5 min，將水相去除後，以 10 ml 冰水清洗沉澱物三次。
3. 將沉澱物置於真空烘箱，40°C 條件下，烘 12 hr，可得到藍色固體 Ag₃CB3GA。
4. 將步驟 3. 所得的 Ag₃CB3GA，加入 50 ml 乙晴溶解之，再加入三倍莫耳數的 [BMIM][Cl]，40°C 攪拌 72 hr。
5. 將所得溶液以 6000 rpm 轉速離心 5 min，去除沉澱物 AgCl，再以旋轉濃縮機去除乙晴。
6. 接著以丙酮溶解粗產物，以 6000 rpm 轉速離心 5 min，去除沉澱物，(Ag₃CB3GA 不溶於丙酮)，將丙酮抽乾後即可得到產物 [BMIM]₃[CB3GA]。
7. 反應如 3-1、3-2，產物以 NMR、Mass、TGA、DSC、UV-vis 鑑定。



3-3-2 製備液相/液相萃取系統

在本實驗中萃取系統分為兩種方式，一種是將親和性染料 CB3GA 水溶液和萃取相 [BMIM][PF₆] 攪拌作用，使部分 CB3GA 轉移到離子液體層。另一種方式則是將親和性染料先合成為離子液體 [BMIM]₃[CB3GA]，以這種具有親和性的離子液體做為萃取劑加到萃取相中。

3-3-2-1 以親和性染料 CB3GA 為萃取劑

1. 取 4×10^{-4} mole (0.336 g) CB3GA 溶於 5 ml H₂O，再加入 10 ml

[BMIM][PF₆]，攪拌平衡一天後，用去離子水清洗萃取相至水層澄清。

2. 取步驟 1. 之離子液體層，利用紫外光-可見光光譜儀做定性分析。



3-3-2-2 以親和性離子液體 [BMIM]₃[CB3GA] 做為萃取劑

1. 分別將 5×10^{-6} 、 10^{-5} 、 2.5×10^{-5} 、 5×10^{-5} 、 10^{-4} 、 2×10^{-4} mole 的

[BMIM]₃[CB3GA] 加到 10 ml [BMIM][PF₆] 中攪拌 10 min 後，利用 20 ml 去離子水清洗五次將過多的 [BMIM]₃[CB3GA] 洗至水層並去除。

2. 定量方法: 將 [BMIM]₃[CB3GA] 溶於 [BMIM][PF₆]，配製成濃度分

別為 0.25、0.5、1.25、2.5、5.0、10.0 mM，各取 100 μl 並加入 4.0 ml 甲醇，由紫外光-可見光光譜儀針對波長 623 nm 吸收值做出

檢量線。再將步驟 1.平衡過後的萃取相各取 100 μ l 並加入 4.0 ml 甲醇，測出波長 623 nm 吸收值，帶入檢量線後，即可得到萃取相中 [BMIM]₃[CB3GA] 的濃度。

3-3-3 配製緩衝溶液

0.05 M KCl / 0.1 M HCl 調配 pH 範圍 1.0-2.2

0.05M Glycine / 0.1M HCl 調配 pH 範圍 2.1-3.5

0.05 M CH₃COOH / 0.05 M CH₃COONa 調配 pH 範圍 3.6-5.0

0.05 M KH₂PO₄ / 0.1 M NaOH 調配 pH 範圍 5.8-6.9

0.05 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethane / 0.1M HCl 調配 pH 範圍 7.0-9.0

0.05M NaHCO₃ / 0.1M NaOH 調配 pH 範圍 9.6-11.0

0.05M Na₂HPO₄ / 0.1M NaOH 調配 pH 範圍 10.9-12.0

3-3-4 萃取蛋白質溶菌酶

3-3-4-1 以親和性染料 CB3GA 為萃取劑

取 3-3-2-1 所得到之萃取相 2.0 ml 加入等體積 200 mg/L、pH 7.0 的溶菌酶水溶液，以磁石攪拌 30 min，靜置 30 min，取上層水溶液做蛋白質定量。

3-3-4-2 以親和性離子液體[BMIM]₃[CB3GA]做為萃取劑

3-3-4-2-1 改變[BMIM]₃[CB3GA]濃度對萃取率影響

正向萃取:取含有 0、0.28、0.61、1.55、2.52、3.80、5.82 mM

[BMIM]₃[CB3GA]之[BMIM][PF₆] 2.0 ml 分別加入等體積 500 mg/L、pH 4.0 的溶菌酶水溶液，以磁石攪拌 30 min，靜置 30 min，取上層水溶液做定量。

3-3-4-2-2 攪拌時間對萃取率影響

正向萃取:取含有 3.80 mM [BMIM]₃[CB3GA]之[BMIM][PF₆] 2.0 ml 分別加入等體積 500 mg/L、pH4.0 的溶菌酶水溶液，以磁石攪拌 0.5、1、5、10、20、30、60 min，靜置 30 min，取上層水溶液做定量。

3-3-4-2-3 改變 pH 值對萃取率影響

(a)對正向萃取之影響

正向萃取:取含有 3.80 mM [BMIM]₃[CB3GA]之[BMIM][PF₆] 2.0 ml 分別加入等體積 500 mg/L、pH 1.0~11.0 的溶菌酶水溶液，以磁石攪拌 30 min，靜置 30 min，取上層水溶液做定量。

(b) 對反向萃取之影響

1.正向萃取: 取含有 3.80 mM [BMIM]₃[CB3GA]之[BMIM][PF₆] 2.0ml 分別加入等體積 500 mg/L、pH 4.0 的溶菌酶水溶液，以磁石攪拌

30 min，靜置 30 min，取上層水溶液做定量。

2. 反向萃取: 取正向萃取完的離子液體層 1.0 ml，加入 1.0 M KCl pH 4.0~11.0 的緩衝溶液 1.0 ml，以磁石攪拌 30 min，靜置 30 min，取上層水溶液做定量。

3-3-4-2-4 使用回收離子液體做萃取

(a)

1. 將萃取過後的離子液體層加入等體積去離子水清洗去除 KCl。
2. 正向萃取: 取清洗過的離子液體層 2.0 ml，加入等體積 500 mg/L、pH 4.0 的溶菌酶水溶液，以磁石攪拌 30 min，靜置 30 min，取上層水溶液做定量。
3. 反向萃取: 將正向萃取完的水層去除，加入 1.0 M KCl pH 11.0 的緩衝溶液 2.0 ml，以磁石攪拌 30 min，靜置 30 min，取上層水溶液做定量。
4. 反向萃取完後，重複步驟 1. 清洗離子液體層，即可重複進行步驟 2 和步驟 3 達到回收利用目的。

(b)

1. 將萃取過後的離子液體層加入等體積 1.0M KCl、pH 11.0 緩衝溶液，以磁石攪拌 30 min，重複兩次以去除殘留在萃取相中的蛋白質，再加入等體積去離子水清洗去除 KCl。
2. 正向萃取: 取清洗過的離子液體層 2.0 ml，加入等體積 500 mg/L、pH

4.0 的溶菌酶水溶液，以磁石攪拌 30 min，靜置 30 min，取上層水溶液做定量。

3.反向萃取:將正向萃取完的水層去除，加入 1.0 M KCl、pH 8.0 的緩衝溶液 2.0 ml，以磁石攪拌 30 min，靜置 30 min，取上層水溶液做定量。

4.反向萃取完後，重複步驟 1.清洗離子液體層，即可重複進行步驟 2 和步驟 3 達到回收利用目的。

3-3-4-2-5 濃縮蛋白質溶菌酶

1.正向萃取: 取含有 3.80 mM [BMIM]₃[CB3GA]之[BMIM][PF₆] 5.0ml 加入等體積 500 mg/L、pH 4.0 的溶菌酶水溶液，以磁石攪拌 30 min，靜置 30 min，取上層水溶液做定量。

2.反向萃取:正向萃取完，將水層去除後，分別加入 5.0、2.5、1.0 ml 的 1.0 M KCl、pH 8.0 緩衝溶液，攪拌 30min，靜置 30 min，取上層水溶液做定量。

3-3-4-2-6 溶菌酶活性測試

1.配製 pH 4、200 mg/L 溶菌酶水溶液，測量其 CD 光譜。

2.將含有 3.80 mM [BMIM]₃[CB3GA]之[BMIM][PF₆]加入等體積 pH 4.0、500 mg/L 溶菌酶水溶液正向萃取之後，再以等體積 1.0 M KCl、pH 8.0 緩衝溶液為做為反向萃取條件，反向萃取完，將上層

水溶液通過 Desalting column 除鹽，再進行 CD 光譜測量。

3-3-5 萃取其他蛋白質水溶液

除了溶菌酶外，本實驗也對卵白蛋白、牛血清蛋白、細胞色素 c 作初步的萃取測試，探討以 $[\text{BMIM}]_3[\text{CB3GA}]$ 為萃取劑時，是否能對其他蛋白質有萃取效果，以及用於純化蛋白質的可能性。

3-3-5-1 萃取個別蛋白質水溶液

- (a) 無添加萃取劑: 取 $[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$ 2.0ml 分別加入等體積 500 mg/L，pH 4.0、pH 7.0、pH 11.0 的蛋白質溶液，以磁石攪拌 30 min，靜置 30 min，取上層水溶液做定量。
- (b) 添加萃取劑: 取含有 3.80 mM $[\text{BMIM}]_3[\text{CB3GA}]$ 之 $[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$ 2.0 ml 分別加入等體積 500 mg/L，pH 4.0、pH 7.0、pH 11.0 的蛋白質水溶液，以磁石攪拌 30 min，靜置 30 min，取上層水溶液做定量。

3-3-5-2 萃取混合蛋白質水溶液

(a) 等濃度蛋白質混合溶液

1. 正向萃取: 取含有 3.80 mM $[\text{BMIM}]_3[\text{CB3GA}]$ 之 $[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$ 2.0 ml 加入等體積 pH 7.0、500 mg/L 溶菌酶、卵白蛋白、牛血清蛋白的混

合水溶液，以磁石攪拌 30 min 靜置 30 min。

2. 反向萃取: 取正向萃取完的離子液體層 1.0 ml，加入 1.0 M KCl、pH 8.0 的緩衝溶液 1.0 ml，以磁石攪拌 30 min，靜置 30 min，取上層水溶液做定量。

(b) 模擬雞蛋蛋白之蛋白質混合溶液

1. 正向萃取: 取含有 3.80 mM [BMIM]₃[CB3GA] 之 [BMIM][PF₆] 2.0 ml 加入等體積 pH 7.0，500 mg/L 溶菌酶、7500 mg/L 卵白蛋白、2000 mg/L 牛血清蛋白混合水溶液，以磁石攪拌 30 min 靜置 30 min。

2. 反向萃取: 取正向萃取完的離子液體層 1.0 ml，加入 1.0 M KCl、pH 8.0 的緩衝溶液 1.0 ml，以磁石攪拌 30 min，靜置 30 min，取上層水溶液做定量。



3-3-6 蛋白質定量方式

本實驗將萃取過後的蛋白質水溶液用 HPLC 分析，接上紫外光偵測器作定量。組成蛋白質的胺基酸帶有芳香基團，在波長 280 nm 會吸光，而蛋白質骨架上的 -C=O 基團在 200 nm 附近會有吸收，但因為 200 nm 波長的光線來源不穩定，而且會受到空氣中氧分子的干擾，因此較難應用。本實驗選擇 280 nm 光源對蛋白質作

定量。而每種蛋白質分子中的芳香基團含量不一，因此在 280 nm 的吸光能力就有差別，也因此各有不同的消光係數。

3-3-6-1 利用 HPLC 定量蛋白質水溶液

1. HPLC 儀器裝置如圖 3-2，用動相 A (含有 0.1 % TFA、20 % ACN 的水溶液)沖提 reverse phase HPLC 使平衡 10 分鐘。
2. 注入 20 μ L 待測物。
3. 以動相 A+B(含有 0.1 % TFA、80 % ACN 的水溶液)，在 15 分鐘內做梯度沖提，紫外光偵測器之吸收波長設定在 280 nm。
4. 以濃度 100、200、500、1000 mg/L 的蛋白質標準品做檢量線，定量各蛋白質水溶液濃度。

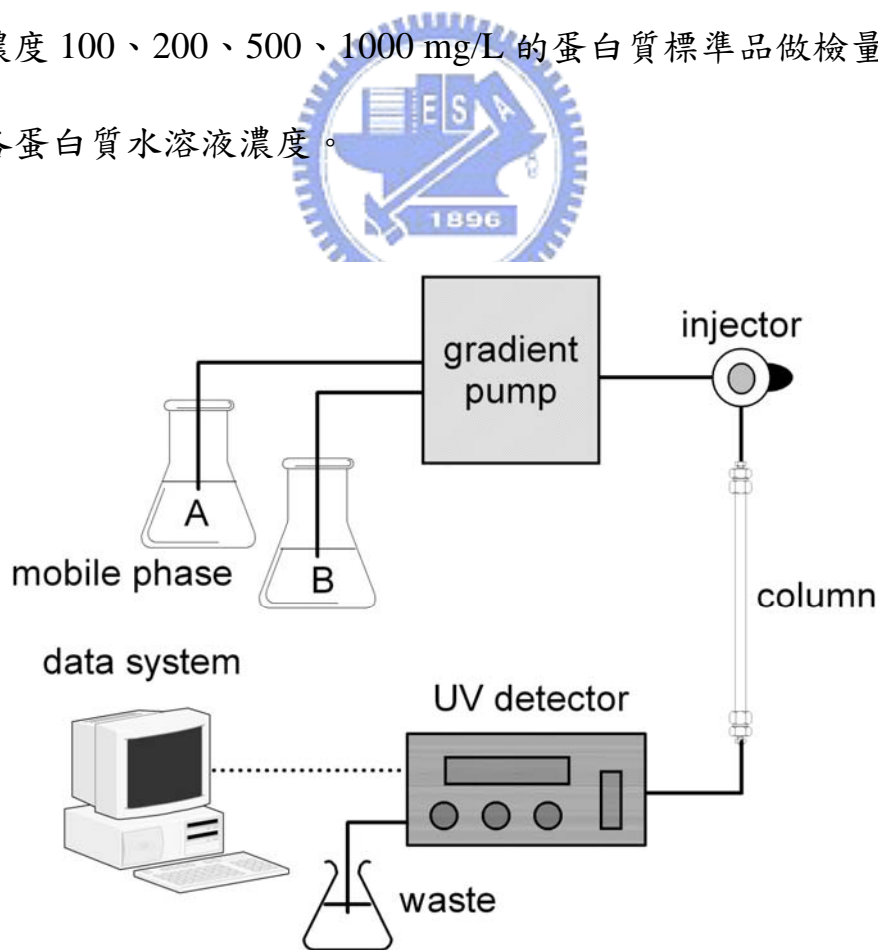


圖 3- 2、HPLC 儀器裝置圖

第四章 結果與討論

4-1 離子液體之合成

本實驗所合成的離子液體包括[BMIM][PF₆]、[BMIM]₃[CB3GA]，在室溫之下[BMIM][PF₆]為金黃色黏稠液體，與水不互溶。[BMIM][PF₆]的¹H-NMR如圖4-1所示，¹H-NMR (300 MHz, CH₃OH-*d*) δ: 8.93 (1H, s, NCHN), 7.73 (1H, s, CH₃NCHCHN), 7.67 (1H, s, CH₃NCHCHN), 4.34 (2H, t, J=7.2 Hz, NCH₂(CH₂)₂CH₃), 4.03 (3H, s, NCH₃), 1.92 (2H, m, NCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.35 (2H, m, N(CH₂)₂CH₂CH₃), 0.93 (3H, t, J=7.2 Hz, N(CH₂)₃CH₃). [BMIM][PF₆]已是被廣泛使用的一種離子液體，其性質也已被鑑定出來⁷⁵。

[BMIM]₃[CB3GA]為深藍色黏稠液體，合成步驟中先利用 AgNO₃和 CB3GA 反應形成 Ag₃CB3GA，產率約 91 %。Ag₃CB3GA 以乙晴溶解後，再加入[BMIM][Cl]攪拌，產生 AgCl 沉澱，移除 AgCl 和溶劑之後，即可得到[BMIM]₃[CB3GA]，產率約 54 %。由[BMIM][Cl]和[BMIM]₃[CB3GA]的¹H-NMR 圖譜比對，可看出化學位移的現象，文獻指出離子液體陰離子不同時，陽離子上的氫會有化學位移產生²⁴。[BMIM][Cl]的¹H-NMR 如圖 4-2，(500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.63 (1H, s, NCHN), 7.92 (1H, s, CH₃NCHCHN), 7.83 (1H, s, CH₃NCHCHN), 4.20

(2H, t, J=7.0 Hz, NCH₂(CH₂)₂CH₃), 3.87 (3H, s, NCH₃), 1.74 (2H, m, NCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.21 (2H, m, N(CH₂)₂CH₂CH₃), 0.85 (3H, t, J=7.0 Hz, N(CH₂)₃CH₃). 而[BMIM]₃[CB3GA] 的 ¹H-NMR 如圖 4-3, (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9.14 (1H, s, NCHN), 7.76 (1H, s, CH₃NCHCHN), 7.69 (1H, s, CH₃NCHCHN), 4.10 (2H, t, J=7.0 Hz, NCH₂(CH₂)₂CH₃), 3.83 (3H, s, NCH₃), 1.74 (2H, m, NCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.24 (2H, m, N(CH₂)₂CH₂CH₃), 0.88 (3H, t, J=7.5 Hz, N(CH₂)₃CH₃).

而質譜儀以 ESI⁺為游離方式可看到[BMIM]⁺的 m/z=139.1, ESI⁻作為游離方式時(圖 4-4), 可看到一個陽離子[BMIM]⁺脫離形成([BMIM]₂[CB3GA])⁻的荷質比 m/z=1048.3, 以及([BMIM][CB3GA])²⁻的 m/z=454.5。由圖 4-5, 微差掃描卡計(DSC)的測量結果可看出[BMIM]₃[CB3GA]的熔點為 8.4°C, 具有吸熱的特徵峰出現。從熱重量分析儀(TGA)測量得到其 T_d(-5%)=250°C (T_d(%):樣品重量損失百分率的溫度)。而圖 4-6 的 UV-vis 吸收圖譜中顯示 CB3GA 的發光團在 623 nm 時有吸收, [BMIM][PF₆]陽離子部分在 210 nm 有吸收, 而[BMIM]₃[CB3GA]則同時兼具有這兩個波段的吸收。

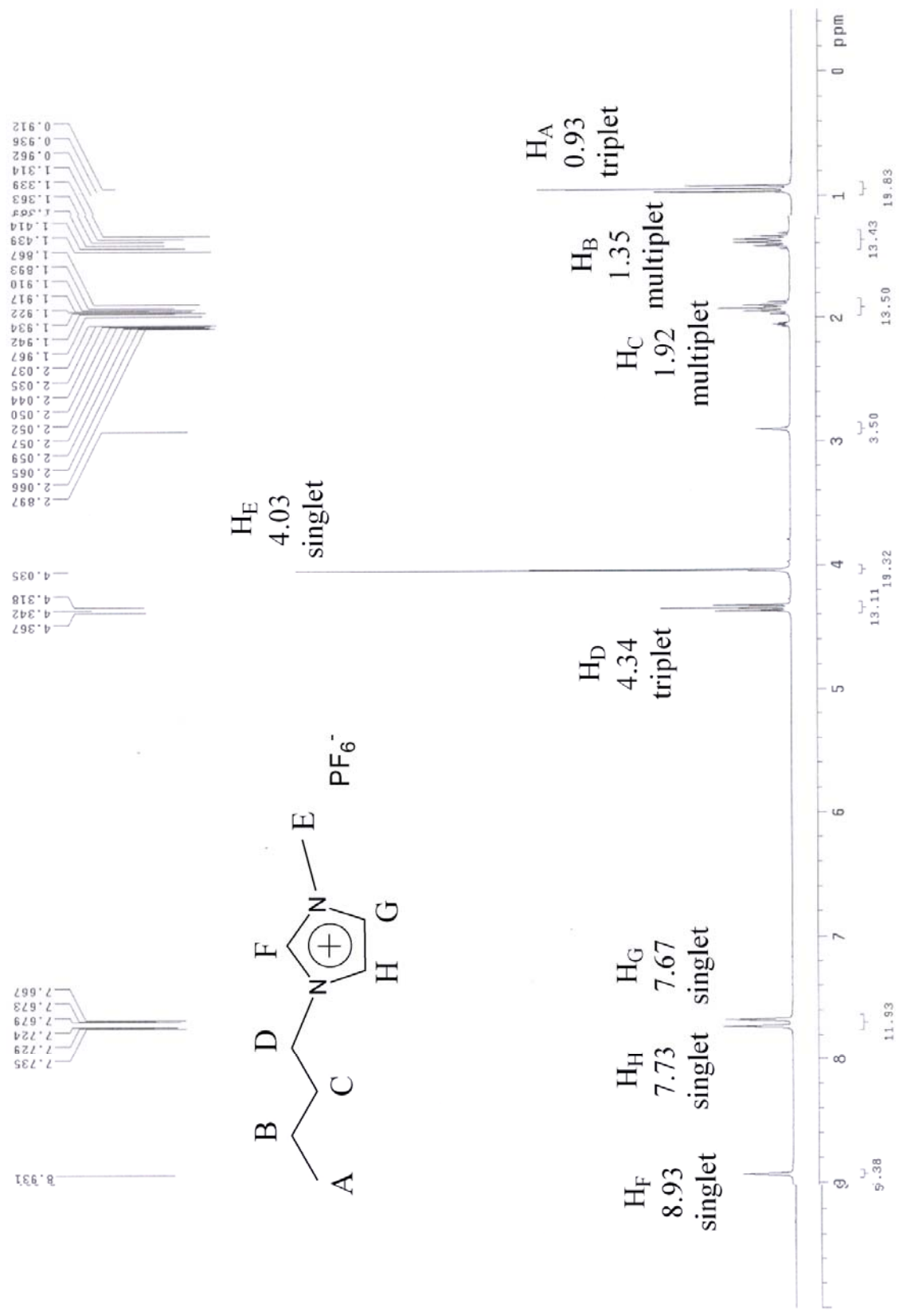


圖 4-1、[BMIM][PF₆] NMR 圖譜

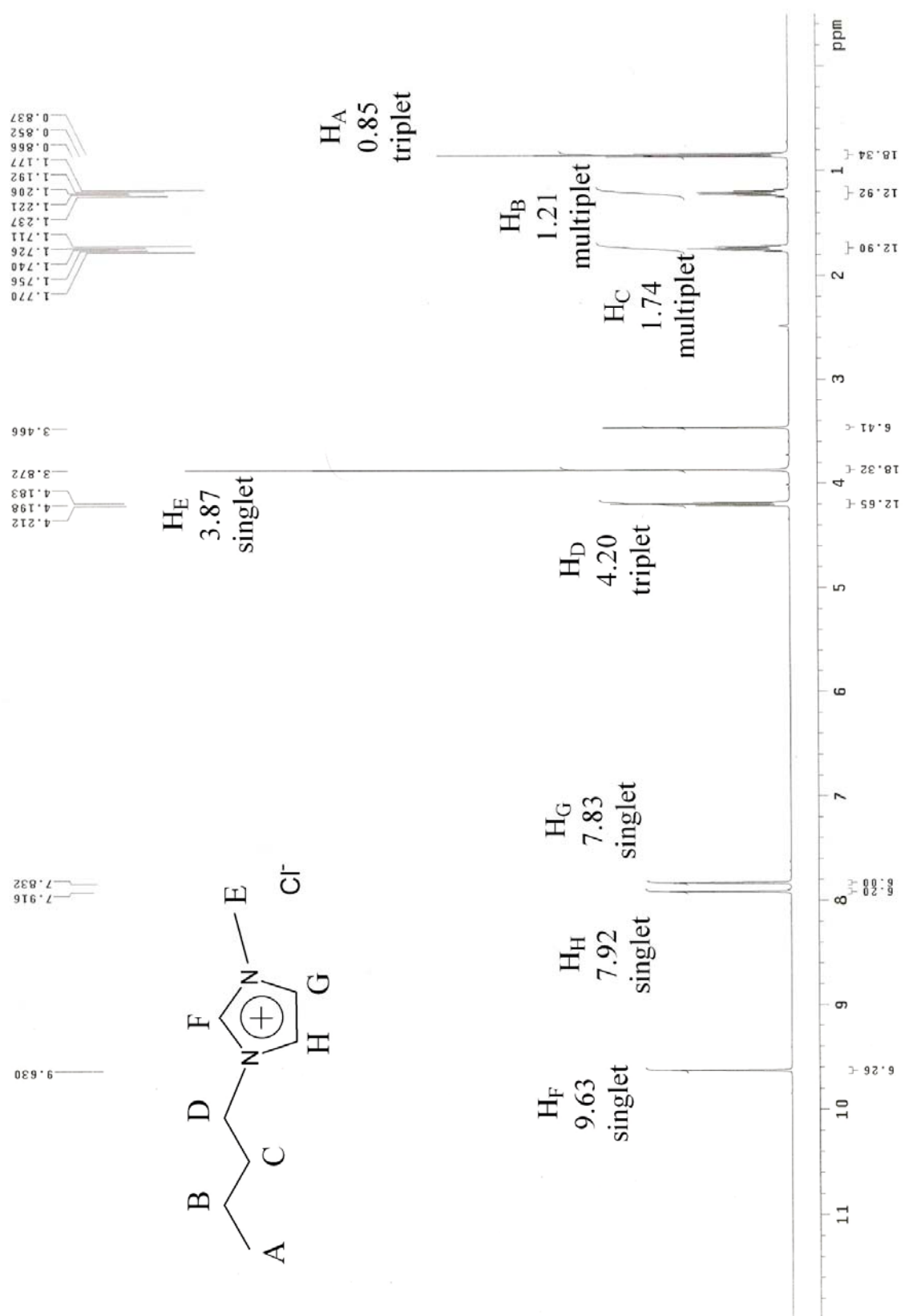


圖 4-2、[BMIM][Cl] NMR 圖譜

([BMIM]₃[CB3GA]) in DMSO-d6
 951013.h
 Pulse Sequence: s2pu1

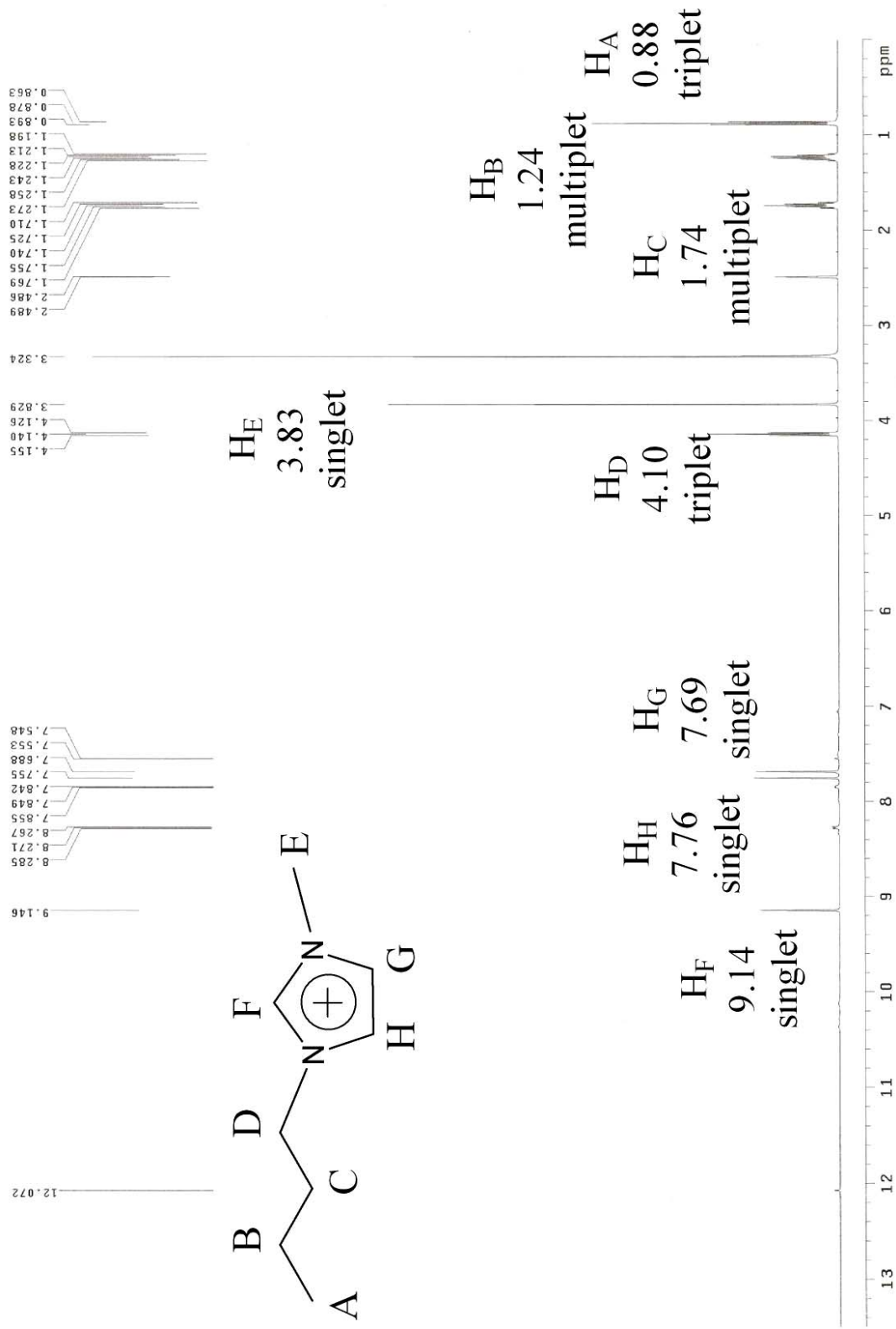


圖 4-3、 [BMIM]₃[CB3GA] NMR 圖譜

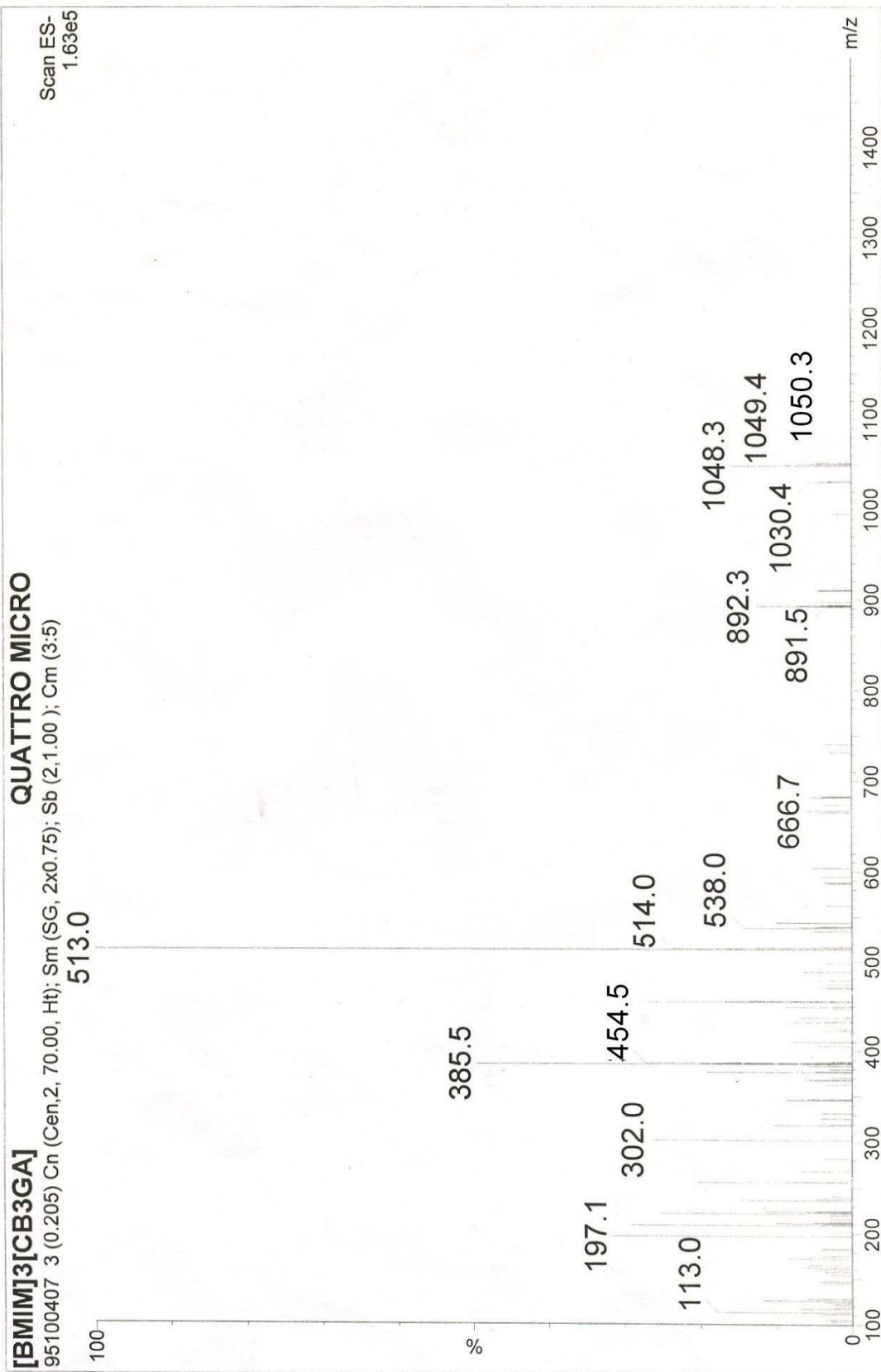


圖 4-4、[BMIM]₃[CB3GA] Mass 圖譜

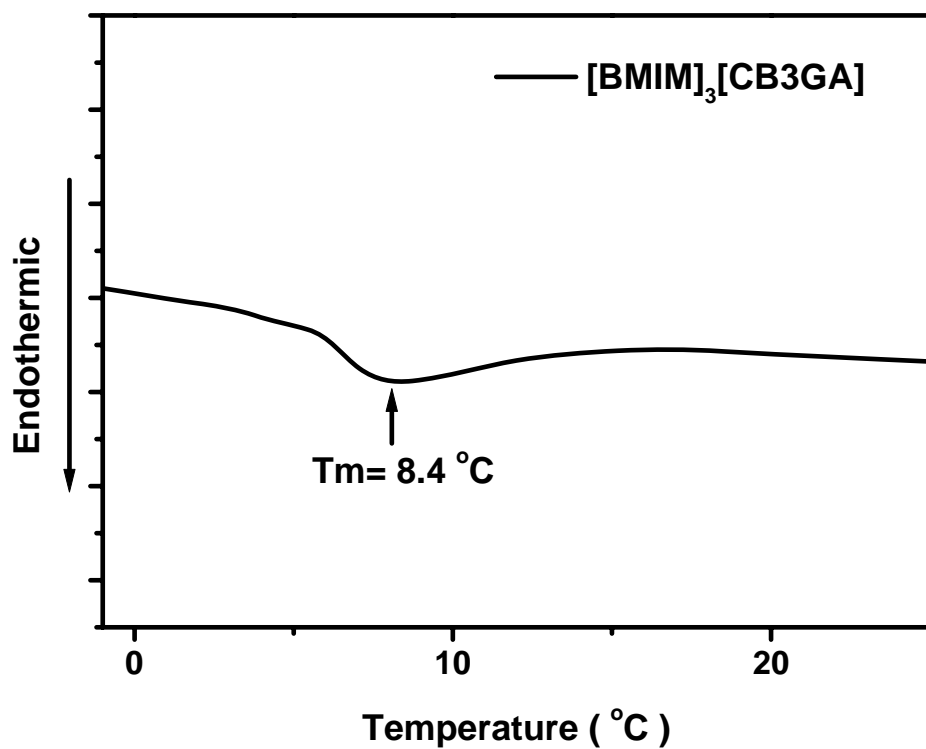


圖 4- 5、[BMIM]₃[CB3GA]之 DSC 圖譜

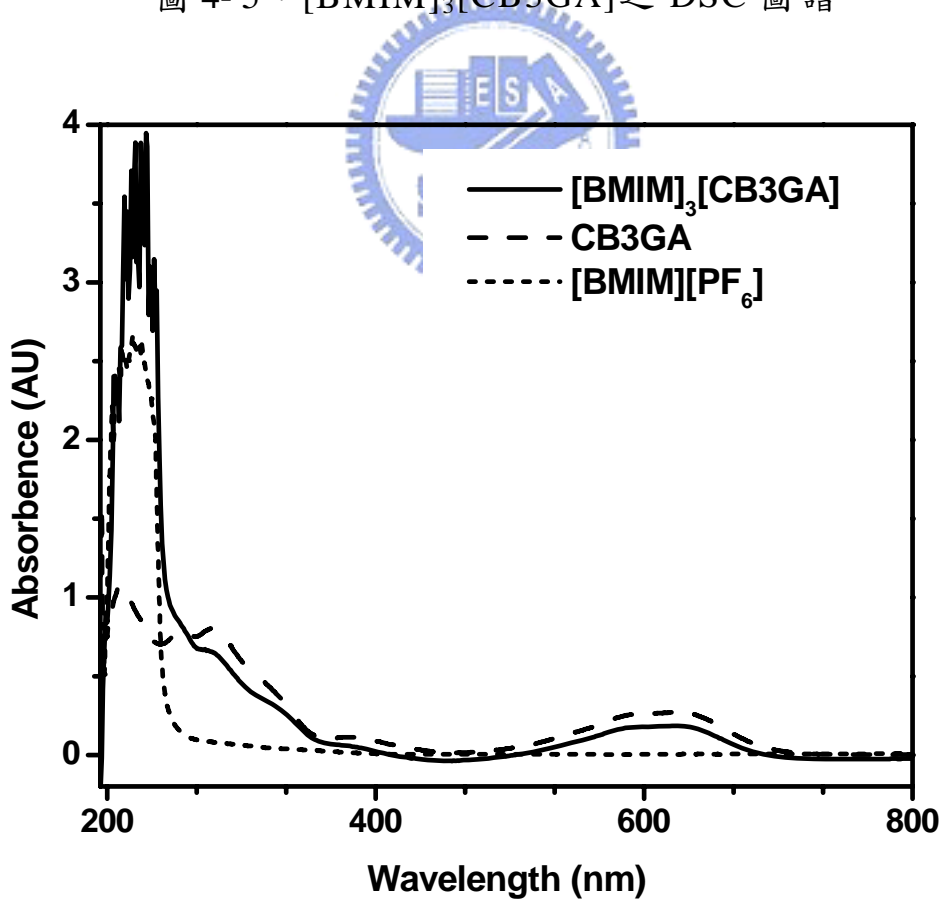


圖 4- 6、[BMIM]₃[CB3GA]之 UV-vis 圖譜

4-2 製備液相/液相萃取系統

本實驗使用 [BMIM][PF₆] 作為萃取相，因其為疏水性的離子液體，在水中溶解度為 0.13% v/v⁷⁵，和水溶液攪拌後可快速分層，其密度比水大，在兩相中位於下層，水溶液在上層。萃取劑方面則選取 CB3GA 和 [BMIM]₃[CB3GA]，因 CB3GA 不溶於 [BMIM][PF₆] (如圖 4-7(b))，將其配製為水溶液後和 [BMIM][PF₆] 攪拌，發現離子液體層由金黃色變橄欖綠，有部分 CB3GA 轉移到離子液體層，但 CB3GA 親水性高，轉移到離子液體層效率差，大部分的 CB3GA 仍留在水相，其 UV-vis 光譜如圖 4-8，吸收波長從 623 nm 位移到 480 nm，推測 CB3GA 在 [BMIM][PF₆] 中經長時間攪拌後，結構可能被破壞，目前尚無法鑑定出此物質為何，且在定量上有困難。用此萃取相在 pH 7.0 條件下萃取 200 mg/L 溶菌酶水溶液，萃取率約為 24.7 %。

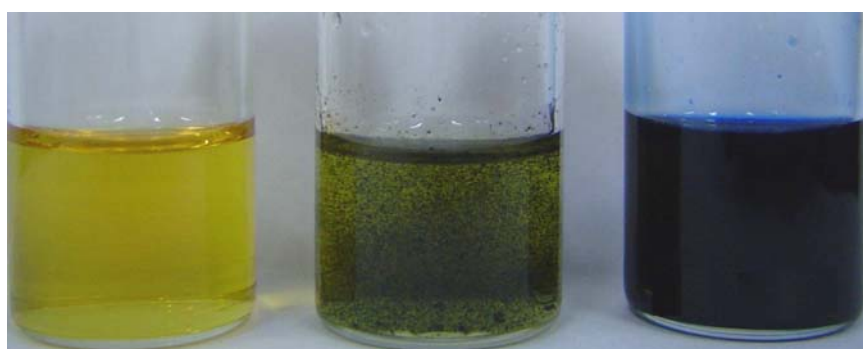


圖 4-7、萃取劑在 [BMIM][PF₆] 中溶解狀況

(a) [BMIM][PF₆], (b) CB3GA 粉末於 [BMIM][PF₆] 中, (c) [BMIM]₃[CB3GA] 於 [BMIM][PF₆] 中。

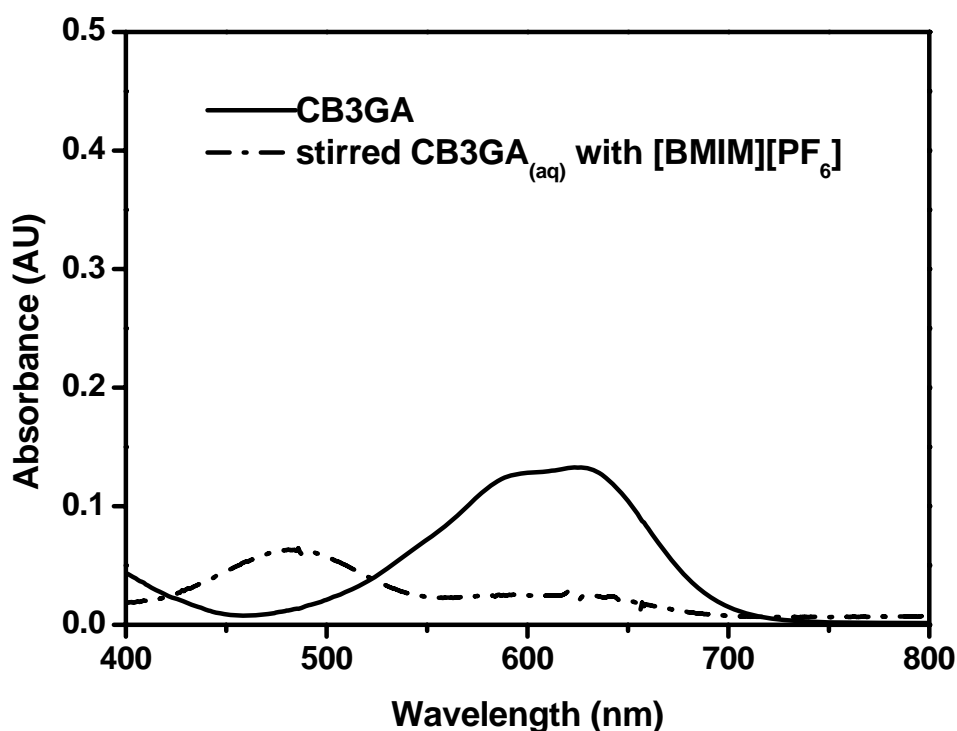


圖 4-8、CB3GA 轉移到[BMIM][PF₆]中之 UV-vis 圖

因此進一步將 CB3GA 合成為離子液體[BMIM]₃[CB3GA]，希望藉由陽離子之間的 π - π 電子間作用力讓[BMIM]₃[CB3GA]溶於[BMIM][PF₆]中，結果如圖 4-7(c)，證實[BMIM]₃[CB3GA]的確能溶於萃取相，加入去離子水平衡後，分別取 100 μ l 的水相和離子液體相，加入 4.0 ml 甲醇稀釋後，利用 UV-vis 測量 623nm 吸收值，估計[BMIM]₃[CB3GA]在水相和離子液體相之間的分佈係數 $K_{U/L} = 0.02$ ，由此可知[BMIM]₃[CB3GA]較偏向於存在於離子液體層。因此本實驗將利用[BMIM]₃[CB3GA]做為萃取劑，萃取蛋白質水溶液。

4-3 萃取蛋白質溶菌酶

本實驗萃取溶菌酶之示意圖如圖 4-9，分為正向萃取及反向萃取兩步驟，正向萃取率(forward extraction efficiency, E_f)和反向萃取率(backward extraction efficiency, E_b)以及蛋白質回收率(recovery, E_r)的定義如下。

$$\text{正向萃取率} = \frac{\text{水相蛋白質初始濃度} - \text{水相剩餘之蛋白質濃度}}{\text{水相蛋白質初始濃度}} \times 100\%$$

$$\text{反向萃取率} = \frac{\text{回到水相之蛋白質濃度}}{\text{正向萃取時進入離子液體相之蛋白質濃度}} \times 100\%$$

$$\text{蛋白質回收率} = \frac{\text{反向萃取回到水相之蛋白質濃度}}{\text{水相蛋白質初始濃度}} \times 100\%$$

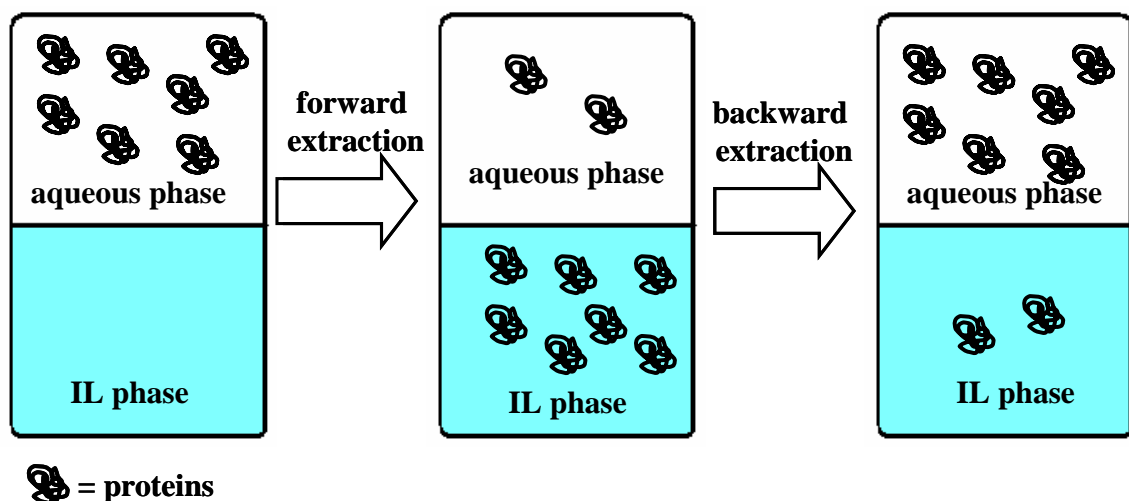


圖 4-9、蛋白質萃取過程示意圖

4-3-1 改變[BMIM]₃[CB3GA]濃度對萃取率影響

利用[BMIM]₃[CB3GA]為萃取劑，在 pH 4.0 條件下萃取 200、500、1000 mg/L 溶菌酶水溶液時，萃取率會隨[BMIM]₃[CB3GA]濃度增加而提高，而這三種濃度的溶菌酶水溶液在[BMIM]₃[CB3GA]濃度增加到 3.8 mM 時，萃取率都達到定值，接近 100 % (如圖 4-10)。而未加入[BMIM]₃[CB3GA]時，有部分的溶菌酶被萃取到離子液體層，但達到高的萃取率是在加入[BMIM]₃[CB3GA]後，因此選用含 3.8 mM [BMIM]₃[CB3GA]的離子液體作為之後的實驗條件。

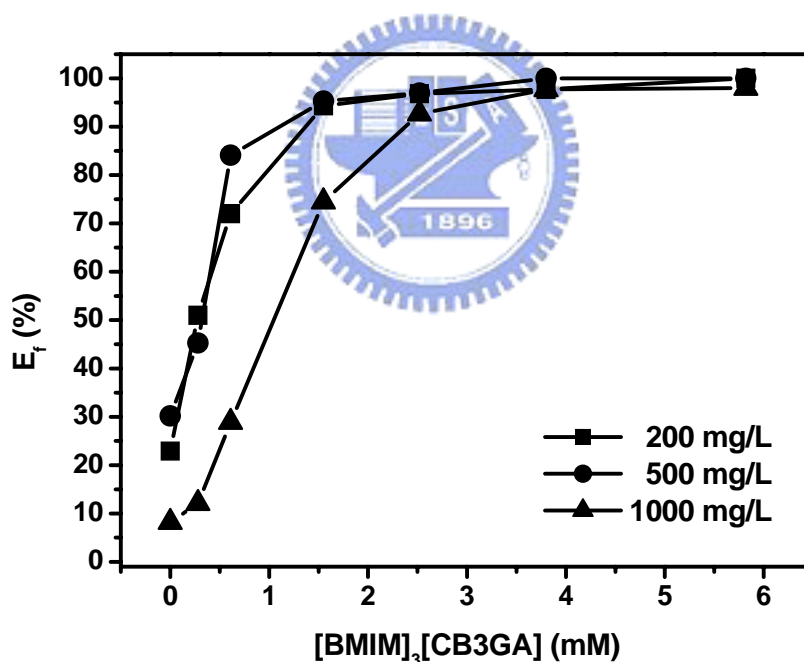


圖 4-10、不同萃取劑濃度對正向萃取率的影響

萃取劑濃度分別為 0、0.28、0.61、1.55、2.52、3.80、5.82 mM，萃取 200、500、1000 mg/L，pH 4.0 溶菌酶水溶液。

4-3-2 攪拌時間對萃取率影響

圖 4-11 顯示萃取溶菌酶時攪拌時間對正向萃取率的影響，從圖中可看出溶菌酶從水相到離子液體相，在 30 秒時萃取率即達到 78%，10 分鐘後可達到 95% 以上，表示此反應很快就能達到平衡，30 分鐘之後萃取率就不再增加，因此實驗條件將萃取時間設定於 30 分鐘。

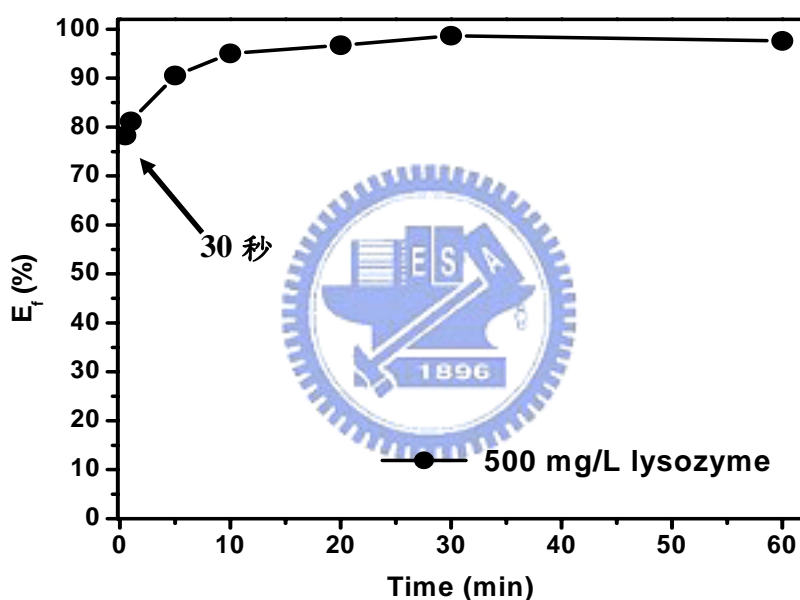


圖 4-11、反應時間對正向萃取率的影響

含有 3.8 mM [BMIM]₃[CB3GA] 針對 500 mg/L 溶菌酶水溶液在 pH 4.0 條件下進行正向萃取，反應時間分別為 0.5、1、5、10、20、30、60 min。

4-3-3 改變 pH 值對萃取率影響

從圖 4-12 可發現正向萃取時，隨著 pH 值增加，溶菌酶萃取率逐

漸降低。有文獻指出胺基酸在離子液體和水之間的分佈行為⁷⁶，當水溶液的 pH 值越低、胺基酸的疏水性越大時，胺基酸越傾向分佈於離子液體層，因而推測胺基酸在低 pH 值是呈現正電性，和離子液體的陰離子之間存有靜電吸引力而分佈係數較大，且 CB3GA 上磺酸基帶的負電荷和蛋白之間亦存在有靜電作用力。由本實驗結果中可看出，溶菌酶的萃取率受到靜電吸引力所影響，當 pH 值較低時，溶菌酶上所帶正電荷越多，如圖 4-13⁷⁷，和離子液體間靜電吸引力越大，因此萃取效果較好，反之，當 pH 增加時，蛋白質上的正電荷數減少，靜電吸引力減弱，導致萃取率下降。

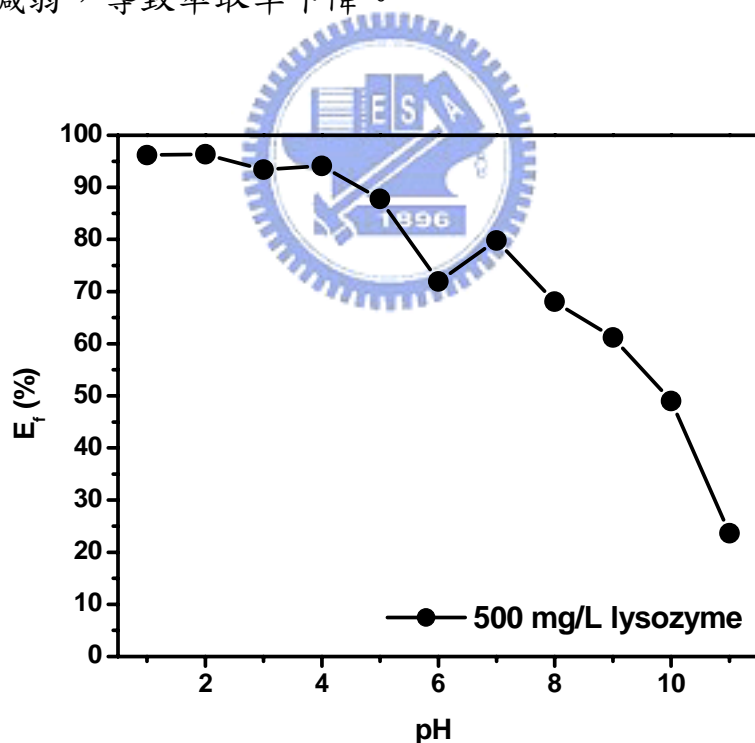


圖 4-12、pH 值對正向萃取率的影響

含有 3.8 mM [BMIM]₃[CB3GA] 針對 500 mg/L 溶菌酶水溶液在 pH 1.0~11.0 條件下進行正向萃取。

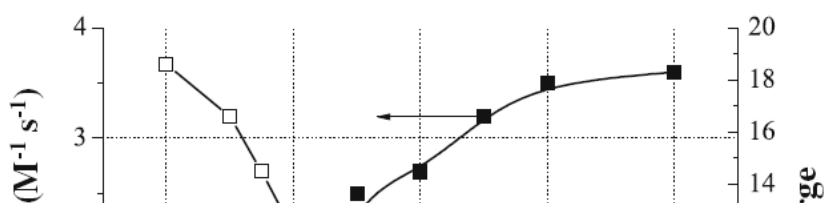


圖 4-13、溶菌酶在不同 pH 值表面所帶電荷數⁷⁷

一般親和性層析在吸附目標物後，會利用含有高鹽類濃度的水溶液使將目標物從靜相脫附而被沖提出來⁷⁸，在本實驗的反向萃取中分別利用 1.0 M 的 NaCl 和 KCl 作為實驗條件，藉由遮蔽效應破壞溶菌酶和 [BMIM]₃[CB3GA] 陰離子磺酸基之間的靜電作用力，使溶菌酶回到水相。以 1.0 M 的 NaCl 在 pH 7.0 條件下反向萃取率約 40 %，而 1.0 M 的 KCl 在 pH 7.0 條件下反向萃取率可達 85 %，與文獻提出的離子半徑越大，遮蔽效應越高相符⁵⁶，因此反向萃取時選用 1.0 M 的 KCl 緩衝溶液。同樣地，改變水溶液酸鹼值，反向萃取所得到的結果正好和正向萃取相反，當 pH 值增高，溶菌酶表面電荷數減少，靜電力較弱，反向萃取率呈現增加的趨勢，如圖 4-14 所示。

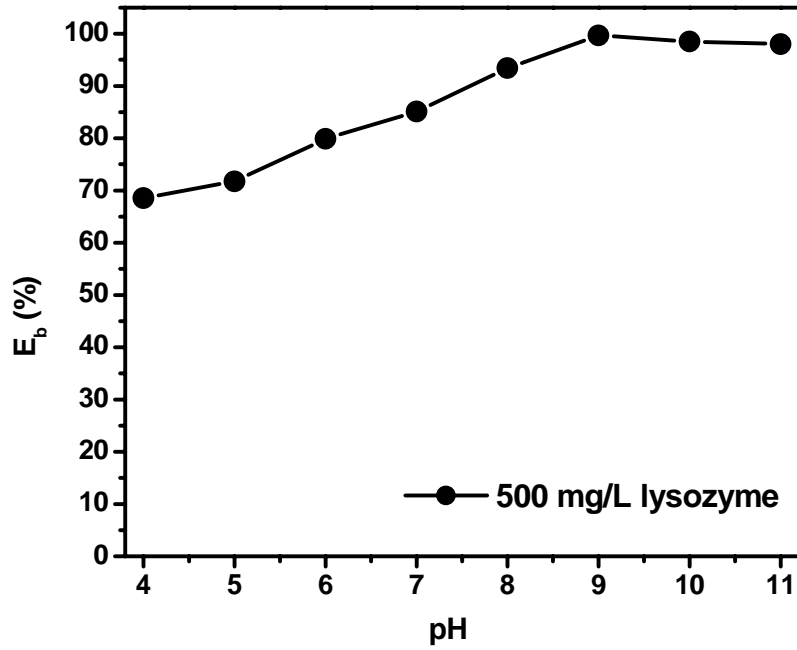


圖 4- 14、pH 值對反向萃取率的影響

含有 3.8 mM [BMIM]₃[CB3GA] 針對 500 mg/L 溶菌酶水溶液在 pH 4.0 條件下進行正向萃取，反向萃取利用 pH 4.0~11.0 的 1.0 M KCl 緩衝溶液為實驗條件。

4-3-4 使用回收離子液體做萃取

離子液體的優勢之一即是可重複利用，減少化學廢棄物，本實驗亦利用使用過的離子液體重複萃取實驗，圖 4-15(a)是利用含有 3.8 mM 的[BMIM]₃[CB3GA]的[BMIM][PF₆]萃取 500 ml/L 溶菌酶，在 pH 4.0 條件下進行正向萃取，反向萃取則利用 1.0 M KCl 高濃度鹽類緩衝溶液在 pH 11.0 環境下進行，反向萃取完利用去離子水清洗萃取相，即進行下一次的正向萃取，如此重複使用離子液體八次，實驗結果顯示正向和反向萃取率皆無下降趨勢，蛋白質回收率維持在 90 % 左右。

而圖 4-15(b)則是利用含有 3.8 mM 的[BMIM]₃[CB3GA] 的[BMIM][PF₆]在 pH 4.0 條件下正向萃取，反向萃取利用 1.0 M KCl 緩衝溶液在 pH 8.0 環境下進行，在此條件下反向萃取率約 93 %，有些許溶菌酶殘留於萃取相，因此反向萃取完利用 pH 11.0、1.0 M KCl 高濃度鹽類緩衝溶液清洗萃取相兩次，再利用去離子水清洗一次後，進行下一次的正向萃取，從圖 4-15(b)可看出正向萃取率並無下降，說明了含有 1.0 M KCl 的高濃度鹽類緩衝溶液在 pH 11.0 時可將離子液體層殘餘溶菌酶洗出。蛋白質回收率亦能維持於 85 % 左右。由這兩個實驗得知，重複利用離子液體作正向萃取及反向萃取時，萃取率幾乎不會下降，可見離子液體中幾乎無殘留的蛋白質分子。

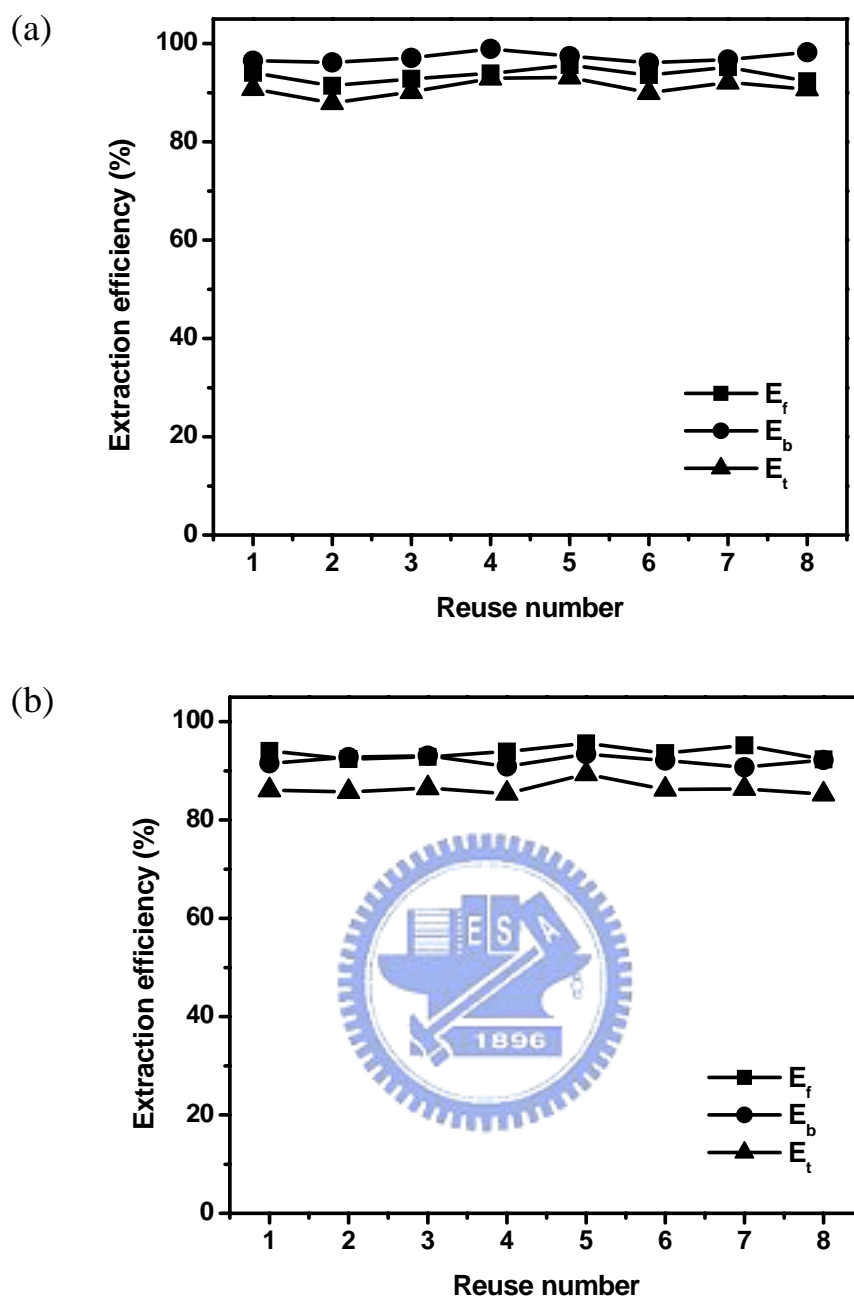


圖 4- 15、重複使用離子液體萃取次數和萃取率的關係圖

(a) 含有 3.8 mM [BMIM]₃[CB3GA]針對 500 mg/L 溶菌酶水溶液在 pH 4.0 條件下進行正向萃取，反向萃取利用 pH 11.0 的 1.0 M KCl 緩衝溶液為實驗條件。(b) 含有 3.8 mM [BMIM]₃[CB3GA]針對 500 mg/L 溶菌酶水溶液在 pH 4.0 條件下進行正向萃取，反向萃取利用 pH 8.0 的 1.0 M KCl 緩衝溶液為實驗條件。

4-3-5 濃縮蛋白質溶菌酶

本實驗也嘗試濃縮蛋白質溶菌酶，在此理論的濃縮倍數分別為 1、2、5 倍，結果如表 4-1，隨著濃縮倍數越大回收率減少，因為濃縮倍數越大，反向萃取時新加入的水相體積越小，可能造成溶菌酶無法完全回到水相，導致回收率降低。不過此實驗證明了以離子液體 [BMIM]₃[CB3GA] 當萃取劑濃縮蛋白質的可行性。

表 4-1、濃縮蛋白質溶菌酶

backward extraction volume (ml)	concentration factor	theoretical value (mg/L)	experimental value (mg/L)	recovery (%)
5	1	500	427.8	85.6
2.5	2	1000	689.9	69.0
1	5	2500	1252.8	50.1

含有 3.8 mM [BMIM]₃[CB3GA] 針對 500 mg/L 溶菌酶水溶液在 pH 4.0 條件下進行正向萃取，反向萃取利用 pH 8.0 的 1.0 M KCl 緩衝溶液為實驗條件。

4-3-6 溶菌酶活性測試

本實驗利用 CD 光譜來確認蛋白質在萃取過程中是否有變性，CD 光譜中 180 nm~250 nm 的遠紫外光區可觀察蛋白質的二級結構；250 nm~350 nm 的近紫外光區則可監測蛋白質的三級結構；當蛋白質

變性導致三度空間構形改變時，二級結構及三級結構皆會發生變化，在CD光譜可直接觀測到。

因此將pH 4.0的溶菌酶水溶液和萃取過後的溶菌酶水溶液做CD光譜的比較，由圖4-16可看出兩者之間幾乎相同，由此可證明溶菌酶在萃取過程當中，仍能保持其立體結構。

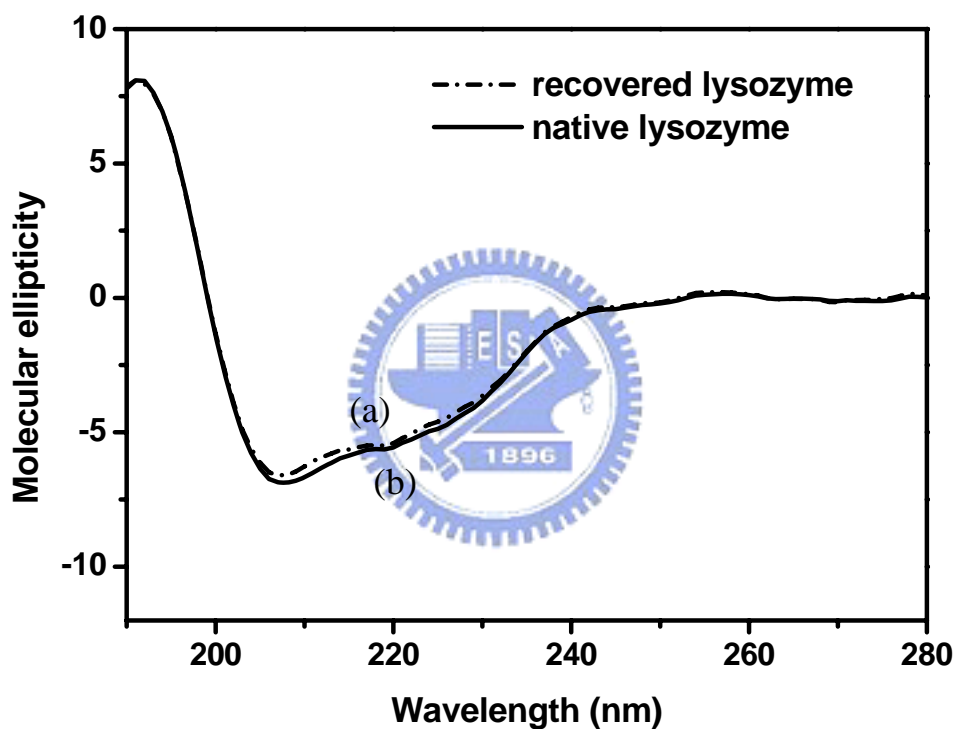


圖 4- 16、溶菌酶水溶液 CD 光譜圖

- (a)經過萃取過程之溶菌酶水溶液(正向萃取:pH 4.0;反向萃取:pH 8.0)，
- (b) pH 4.0 之原始態溶菌酶水溶液

4-4 萃取其他蛋白質

4-4-1 分別萃取蛋白質水溶液

為了探討[BMIM]₃[CB3GA]與蛋白質之間作用力和選擇性，除了溶菌酶，本實驗也嘗試萃取其他蛋白質，包含牛血清蛋白、卵白蛋白、色素細胞 c，其 HPLC 層析圖如圖 4-17。

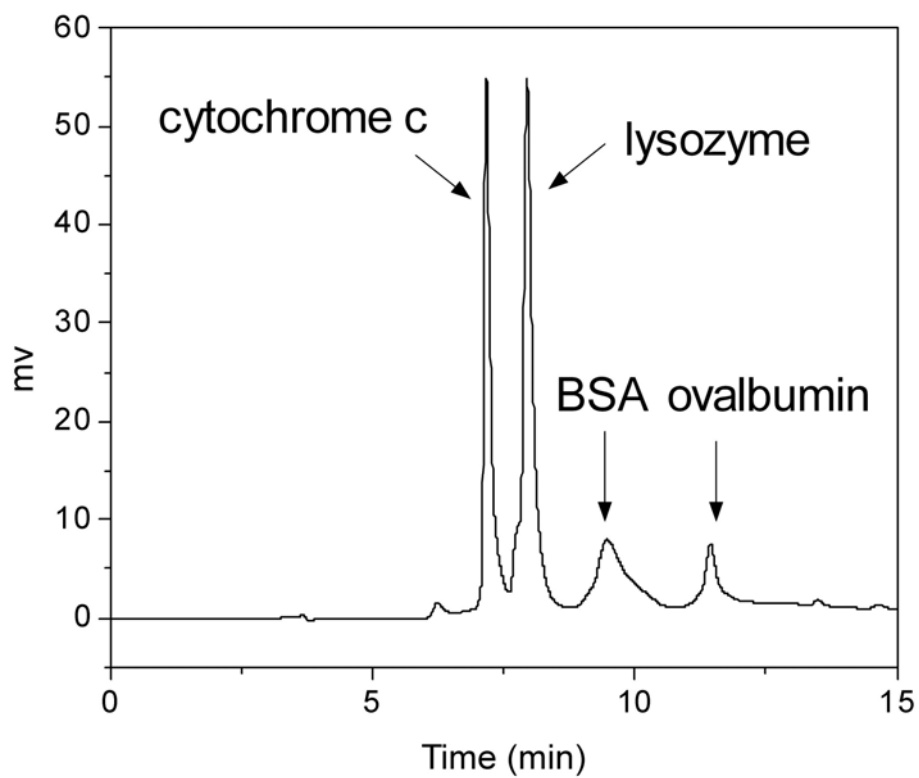


圖 4-17、蛋白質水溶液 HPLC 層析圖

從左至右為細胞色素 c、溶菌酶、牛血清蛋白、卵白蛋白

其中卵白蛋白和溶菌酶來源皆是雞蛋蛋白，而同屬雞蛋蛋白中的伴白蛋白(conalbumin)因價格昂貴，在此以分子量、親疏水性、等電點相近的牛血清蛋白取代，選用色素細胞 c 則是為了比較蛋白質等電點(pI)和萃取率之間的關係。

當利用含 3.8 mM [BMIM]₃[CB3GA]的萃取相，在 pH 7.0 條件下分別萃取這四種蛋白質水溶液時，發現溶菌酶有 81.2±2.4 % 萃取率(如表 4-2)，而色素細胞 c 亦有 6.2±1.5 % 的萃取率，卵白蛋白和牛血清蛋白則無萃取效果。利用未加入[BMIM]₃[CB3GA]的萃取相作空白實驗，發現溶菌酶和細胞色素 c 萃取率分別為 4.4±1.1 %、6.1±0.6 %，由此證實細胞色素 c 在未加入萃取劑時就有些許萃取率，並非 [BMIM]₃[CB3GA]造成其萃取效果，而在空白實驗有萃取效果的兩種蛋白質等電點都在 10.0 以上，推測是蛋白質在 pH 7.0 時帶正電，和萃取相[BMIM][PF₆]的陰離子有靜電吸引力。

為了進一步探討蛋白質和離子液體間的作用力，分別在 pH 4.0、pH 11.0 條件下作萃取，可由表 4-2 看出在 pH 4.0 時四種蛋白質在空白實驗時即有萃取率，加入[BMIM]₃[CB3GA]後，四種蛋白質萃取率皆在 80 % 以上，在 pH 4.0 條件下此系統對於蛋白質的選擇性不佳。而在 pH 11.0 時不論是空白實驗或加入萃取劑後，幾乎都無法萃取蛋白質，只有溶菌酶在添加[BMIM]₃[CB3GA]後有 23.6±2.6 % 的萃取

率，推測[BMIM]₃[CB3GA]和溶菌酶之間除了靜電作用力，亦有其他作用力存在。

表 4-2、蛋白質水溶液分別在不同 pH 值的正向萃取率

萃取相	溶菌酶	卵白蛋白	牛血	細胞	
			清蛋白	色素 c	
pI	10.7	4.5	4.6	10.5	
pH4	[BMIM][PF ₆]	30.2±4.1 ^[a]	83.8±6.4	29.4±3.2	34.4±4.1
	3.8mM [BMIM] ₃ [CB3GA] in [BMIM][PF ₆]	95.4±1.1	84.0±4.4	96.1±1.4	95.1±4.8
pH7	[BMIM][PF ₆]	4.4±1.1	-- ^[b]	--	6.1±0.6
	3.8mM [BMIM] ₃ [CB3GA] in [BMIM][PF ₆]	81.2±2.4	--	--	6.2±1.5
pH11	[BMIM][PF ₆]	--	--	--	--
	3.8mM [BMIM] ₃ [CB3GA] in [BMIM][PF ₆]	23.6±2.6	--	--	--

萃取劑為 3.8 mM [BMIM]₃[CB3GA]，蛋白質水溶液濃度為 500 mg/L。

^[a]實驗次數為 3 次，^[b]--無法測得。

4-4-2 萃取混合蛋白質水溶液

除了個別萃取蛋白質水溶液，本實驗也模擬雞蛋蛋白成分，將溶菌酶、卵白蛋白和牛血清蛋白混合作初步測試。由上節的討論發現在 pH 7.0 時，含萃取劑的萃取相在這三種蛋白質中只對溶菌酶有萃取效果，所以選擇用此條件來萃取蛋白質混合溶液。萃取結果如表 4-3(a)，在分別萃取蛋白質溶液時，卵白蛋白和牛血清蛋白並無萃取效果，但混合溶液中卻有部分被萃取，推測是蛋白質之間的靜電作用力所導致⁷⁸，因溶菌酶在 pH 7.0 的時候帶正電，卵白蛋白和牛血清蛋白帶負電，使得溶菌酶在萃取到離子液體層時，經由靜電作用力把其他兩種蛋白質部分轉移到離子液體層。在反向萃取部分，選用 pH 8.0、1.0M KCl 的緩衝溶液將蛋白質從萃取相反萃回水相，表 4-3(a)顯示溶菌酶的反向萃取率為 $33.0 \pm 6.1\%$ ，比個別萃取時的反向萃取率低許多，原因尚無法確定，推測是混合蛋白質造成的影響，卵白蛋白反向萃取率為 $64.7 \pm 1.4\%$ ，牛血清蛋白則偵測不到。計算蛋白質回收率，溶菌酶為 $29.8 \pm 6.1\%$ ，卵白蛋白為 $4.0 \pm 1.5\%$ ，溶菌酶相對濃度從 33.3% 增加為 $86.9 \pm 6.1\%$ 。

另外，針對模擬雞蛋蛋白成分的比例亦作了測試，在雞蛋蛋白中溶菌酶佔 3.4%，卵白蛋白佔 54.0%，伴白蛋白佔 12.0% (以牛血清蛋白取代)，在此以 500 mg/L 溶菌酶、2000 mg/L 牛血清蛋白、7500 mg/L 卵白蛋白混合水溶液模擬，萃取效果如表 4-3(b)，因卵白蛋白

和牛血清蛋白的含量提高許多，相對的進入離子液體層的比例也增高，從回收率可計算出溶菌酶含量為 151.0 mg/L，卵白蛋白為 740.1 mg/L，牛血清蛋白為 166.0 mg/L，溶菌酶的相對濃度從 5.0 % 提高至 14.3%。由結果得知，當卵白蛋白和牛血清蛋白濃度提高時，利用此條件純化溶菌酶的效果不甚理想。萃取混合蛋白質的部分在此只利用一種條件，未來可嘗試其他條件，以達到更好的純化效果。

表 4-3、混合蛋白質水溶液之萃取率

(a) 利用 3.8 mM [BMIM]₃[CB3GA] 萃取 500 mg/L 溶菌酶、卵白蛋白和牛血清蛋白混合水溶液

	溶菌酶	卵白蛋白	牛血清蛋白
E _f (%) ^[a]	83.6±3.9 ^[c]	6.9±3.2	0.5±0.8
E _b (%) ^[b]	33.0±6.1	64.7±1.4	-- ^[d]
E _t (%)	29.0±6.1	4.0±1.5	--

^[a]正向萃取:pH=7.0, ^[b]反向萃取:1.0 MKCl,pH=8.0, ^[c]實驗次數:3 次, ^[d]--無法測得。

(b) 利用 3.8 mM [BMIM]₃[CB3GA] 萃取 500 mg/L 溶菌酶、2000 mg/L 牛血清蛋白、7500 mg/L 卵白蛋白混合水溶液

	溶菌酶	卵白蛋白	牛血清蛋白
E _f (%) ^[a]	87.9 ^[c]	17.5	9.0
E _b (%) ^[b]	34.4	56.5	92.7
E _t (%)	30.2	9.87	8.3

^[a]正向萃取:pH=7.0, ^[b]反向萃取:1.0 MKCl,pH=8.0, ^[c]實驗次數:1 次。

第五章 結論

本實驗利用將染料配體 CB3GA 經由簡單的離子交換過程，合成為具有親和性的離子液體[BMIM]₃[CB3GA]，並將其作為萃取劑溶於疏水性離子液體[BMIM][PF₆]，萃取蛋白質溶菌酶。由實驗結果證實此液相/液相萃取系統對於溶菌酶有良好的回收率。

染料配體能純化蛋白質除了結構類似天然配體之外，其磺酸基在一般條件下會解離帶負電荷，和蛋白質之間可經由靜電作用力達到吸附效果，本實驗中改變溶菌酶水溶液 pH 值，印證蛋白質上所帶電荷越多，在正向萃取時越容易被萃取到離子液體層。除了靜電作用力之外，蛋白質疏水性、蛋白質和離子液體之間其他作用力也可能是影響萃取率的因素。

染料配體因其結構不同，純化的蛋白質種類亦有所差異，未來可將不同種類的染料合成為離子液體，針對不同蛋白質做萃取。在混合蛋白質實驗中，若能降低蛋白質之間作用力，則可提高親和性離子液體在蛋白質上的選擇性。

本實驗液相/液相萃取過程中皆無使用有機溶劑，回收使用過後的離子液體做萃取，溶菌酶的回收率仍能維持在一定範圍，符合環保概念。此技術未來也許可使用於蛋白質的純化和濃縮。

參考文獻

1. P. T. Anastas, J. B. Zimmerman, "Design through the 12 principles of green engineering" *Environ. Sci. Technol. A*-Pages 37 (2003) 94A.
2. L. A. Blanchard, D. Hancu, E. J. Beckman, J. F. Brennecke, "Green processing using ionic liquids and CO₂" *Nature* 399 (1999) 28.
3. J. G. Huddleston, H. D. Willauer, R. P. Swatloski, A. E. Visser, R. D. Rogers, "Room temperature ionic liquids as novel media for 'clean' liquid-liquid extraction" *Chem. Commun.* 16 (1998) 1765.
4. T. Welton, "Room-Temperature Ionic Liquids. Solvents for Synthesis and Catalysis" *Chem. Rev.* 99 (1999) 2071.
5. P. Wasserscheid, W. Keim, "Ionic Liquids-New "Solutions" for Transition Metal Catalysis" *Angew. Chem. Int. Ed.* 39 (2000) 3772.
6. C. J. Adams, M. J. Earle, G. Roberts, K. R. Seddon, "Friedel-Crafts reaction in room temperature ionic liquids" *Chem. Commun.* 19 (1998) 2097.
7. R. A. Sheldon, "Catalytic reactions in ionic liquids" *Chem. Commun.* 23 (2001) 2399.
8. H. Matsumoto, M. Yanagida, K. Tanimoto, M. Nomura, Y. Kitagawa, Y. Miyazaki, "Highly conductive room temperature molten salts based on small trimethylalkylammonium cations and Bis(trifluoromethylsulfonyl) imide" *Chem. Lett.* 29 (2000) 922.

9. E. Z. Hamad, W. Ijaz, S. A. Ali, M. A. Hastaoglu, "Influence of polymer structure on protein partitioning in two-phase aqueous Systems" *Biotechnol. Prog.* 12 (1996) 173.
10. K. Naoe, K. Noda, T. Konishi, M. Kawagoe, M. Imai, "Liquid-liquid extraction of alpha-lactalbumin using reverse micellar organic solvent." *Biofactors.* 22 (2004) 347.
11. Y. Nishii, Y. Kishi, M. Ito, Y. Morita, A. Kanoh, M. Shintani, T. Kinugasa, S. Nii, K. Takahashi, "Effect of cation species on equilibrium of reversed micellar extraction of lysozyme." *Sep. Purif. Technol.* 37 (2004) 161.
12. K. Shimojo, K. Nakashima, N. Kamiya, M. Goto, "Crown ether-mediated extraction and functional conversion of Cytochrome c in Ionic Liquids" *Biomacromolecules* 7 (2006) 2.
13. 陳俊竹，"應用離子液體於蛋白質液相/液相萃取"，國立交通大學，碩士論文，民國九十四年六月。
14. Y. Sun, S. Ichikawa, S. Sugiura, S. Furusaki, "Affinity extraction of proteins with a reversed micellar system composed of Cibacron Blue-modified lecithin" *Biotechnol. Bioeng.* 58 (1998) 58.

15. J. S. Wilkes, J. A. Levisky, R. A. Wilson, C. L. Hussey, "Dialkylimidazolium chloroaluminate melts: a new class of room-temperature ionic liquids for electrochemistry, spectroscopy, and synthesis" *Inorg. Chem.* 21 (1982) 1263.
16. F. H. Hurley, T. P. Wier, *J. Electrochem. Soc.* 98 (1951) 207.
17. H. L. Chum, V. R. Koch, L. L. Miller, R. A. Osteryoung, "An electrochemical scrutiny of organometallic iron complexes and hexamethylbenzene in a room temperature molten salt" *J. Am. Chem. Soc.* 97 (1975) 3264.
18. J. S. Wilkes, M. J. Zaworodtko, "Air and water stable 1-ethyl-3-methylimidazolium based ionic liquids" *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 13 (1992) 965.
19. J. H. Davis, P. A. Fox., "From curiosities to commodities: ionic liquids begin the transition" *Chem. Commun.* 11 (2003) 1209.
20. A. M. Leone, S. C. Weatherly, M. E. Williams, H. H. Thorp, R. W. Murray, "An ionic liquid form of DNA: redox-active molten salts of nucleic acids" *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001), 218.
21. K. Fukumoto, M. Yoshizawa, H. Ohno, "Room temperature ionic liquids from 20 natural amino acids" *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 2398.

22. S. Hayashi, H. Hamaguchi, "Discovery of a magnetic ionic liquid [bmim]FeCl₄" Chem. Lett. 33 (2004) 1590.
23. J.-f. Liu, J. A. Jonsson, G.-b. Jiang, "Application of ionic liquids in analytical chemistry" Trends Anal. Chem. 24 (2005) 20.
24. P. Bonhote, A. Dias, N. Papageorgiou, K. Kalyanasundaram, M. Grätzel, "Hydrophobic, highly conductive ambient-temperature molten salts" Inorg. Chem. 35 (1996) 1168.
25. J. G. Huddleston, A. E. Visser, W. M. Reichert, H. D. Willauer, G. A. Broker, R. D. Rogers, "Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation" Green Chem. 3 (2001) 156.
26. J. L. Anderson, D. W. Armstrong, G.-T. Wei, "Ionic liquids in analytical chemistry" Anal. Chem. A-Pages 78 (2006) 2892.
27. S. Pandey, "Analytical applications of room-temperature ionic liquids: A review of recent efforts" Anal. Chim. Acta 556 (2006) 38.
28. J. L. Anderson, J. Ding, T. Welton, D. W. Armstrong, "Characterizing ionic liquids on the basis of multiple solvation interactions" J. Am. Chem. Soc. 124 (2002) 14247.

29. S. Dai, Y. H. Ju, C. E. Barnes, "Solvent extraction of strontium nitrate by a crown ether using room-temperature ionic liquids" J. Chem. Soc., Dalton Trans. 8 (1999) 1201.
30. H. Luo, S. Dai, P. V. Bonnesen, "Solvent extraction of Sr^{2+} and Cs^+ based on room-temperature ionic liquids containing monoaza-substituted crown ethers" Anal. Chem. 76 (2004) 2773.
31. S. V. Smirnova, I. I. Torocheshnikova, A. A. Formanovsky, I. V. Pletnev, "Solvent extraction of amino acids into a room temperature ionic liquid with dicyclohexano-18-crown-6" Anal. Bioanal. Chem. 378 (2004) 1369.
32. K. Shimojo, N. Kamiya, F. Tani, H. Naganawa, Y. Naruta, M. Goto, "Extractive solubilization, structural change, and functional conversion of cytochrome c in ionic liquids via crown ether complexation" Anal. Chem. 78 (2006) 7735.
33. A. E. Visser, R. P. Swatloski, W. M. Reichert, R. Mayton, S. Sheff, A. Wierzbicki, J. H. Davis, Jr., R. D. Rogers, "Task-specific ionic liquids incorporating novel cations for the coordination and extraction of Hg^{2+} and Cd^{2+} : Synthesis, characterization, and extraction studies" Environ. Sci. Technol. 36 (2002) 2523.
34. G.-T. Wei, Z. Yang, C.-Y. Lee, H.-Y. Yang, C. R. Chris Wang "Aqueous-organic phase transfer of gold nanoparticles and gold nanorods using an Ionic Liquid" J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 5036.

35. A. E. Visser, R. P. Swatloski, R. D. Rogers, "pH-Dependent partitioning in room temperature ionic liquids provides a link to traditional solvent extraction behavior" *Green Chem.* 2 (2000) 1.
36. C. Li, B. Xin, W. Xu, Q. Zhang, "Study on the extraction of dyes into a room-temperature ionic liquid and their mechanisms" *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82 (2007) 196.
37. L. A. Blanchard, J. F. Brennecke, "Recovery of organic products from ionic liquids using supercritical carbon dioxide" *Ind. Eng. Chem. Res.* 40 (2001) 287.
38. D. W. Armstrong, L. He, and Y.-S. Liu, "Examination of ionic liquids and their interaction with molecules, when used as stationary phases in gas chromatography" *Anal. Chem.* 71 (1999) 3873.
39. J. L. Anderson, D. W. Armstrong, "Immobilized ionic liquids as high-selectivity/high-temperature/high-stability gas chromatography stationary phases" *Anal. Chem.* 77 (2005) 6453.
40. D. W. Armstrong, L.-K. Zhang, L. He, M. L. Gross, "Ionic liquids as matrixes for matrix-assisted laser desorption/ionization Mass spectrometry" *Anal. Chem.* 73 (2001) 3679.

41. N. R. Isola, Z. Liu, S. L. Allman, N. I. Taranenko, Y. Kong, C. H. Chen, “Matrix-assisted laser desorption/ionization detection of polymerase chain reaction products by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase” *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 532.
42. C. Larsson, “Isolation of membranes and organelles from plant cells” *Academic Pr, New York* chapter11 (1983) 277.
43. N. L. Abbott, D. Blankschtein, T. A. Hatton, “Protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems. 5. Decoupling of the effects of protein concentration, salt type, and polymer molecular weight” *Macromolecules* 26 (1993) 825.
44. M. Carlsson, P. Linse, F. Tjerneld, “Temperature-dependent protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems” *Macromolecules* 26 (1993) 1546.
45. A. P. B. Rabelo, E. B. Tambourgi, A. Pessoa, “Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO–PPO–PEO block copolymers” *J. Chromatogr. B* 807 (2004) 61.
46. M. L. Magri, R. B. Cabrera, M. V. Miranda, H. M. Fernández-Lahore, O. Cascone, “Performance of an aqueous two-phase-based countercurrent chromatographic system for horseradish peroxidase purification” *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 1701.

47. K. Shinomiya, Y. Kabasawa, K. Yanagidaira, H. Sasaki, M. Muto, T. Okada, Y. Ito, "Protein separation by nonsynchronous coil planet centrifuge with aqueous–aqueous polymer phase systems" *J. Chromatogr. A* 1005 (2003) 103.
48. P. L. Luisi, L. J. Magid, "Solubilization of enzymes and nucleic acids in hydrocarbon micellar solutions." *Crit. Rev. Biochem.* 20 (1986) 409.
49. E. B. Leodidis, T. A. Hatton, "Amino acids in AOT reversed micelles. determination of interfacial partition coefficients using the phase-transfer method." *J. Phys. Chem.* 94 (1990) 6400.
50. E. B. Leodidis, T. A. Hatton, "Amino acids in AOT reversed micelles. The hydrophobic effect and hydrogen bonding as driving forces for interfacial solubilization." *J. Phys. Chem.* 94 (1990) 6411.
51. R. B. G. Wolbert, R. Hilhorst, G. Voskuilen, H. Nachtegaal, M. Dekker, K. van't Riet, B. H. Bijsterbosch, "Protein transfer from an aqueous phase into reversed micelles. The effect of protein size and charge distribution" *Eur. J. Biochem.* 184 (1989) 627.
52. K. E. Goklen, T. A. Hatton, "Liquid-liquid extraction of low molecular proteins by selective solubilization in reversed micelles" *Sep. Sci. Technol.* 22 (1987) 931.

53. M. J. Pires, M. R. Aires-Barros, J. M. S. Cabral, "Liquid-liquid extraction of proteins with reverse micelles" *Biotechnol. Prog.* 12 (1996) 290.
54. K. Naoe, M. Nishino, T. Ohsa, M. Kawagoe, M. Imai, "Protein extraction using sugar ester reverse micelles." *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 74 (1999) 221.
55. K. E. Goklen, T. A. Hatton, "Protein extraction using reverse micelles." *Biotechnol. Prog.* 1 (1985) 69.
56. T. Kinugasa, A. Kondo, E. Mouri, S. Ichikawa, S. Nakagawa, Y. Nishii, K. Watanabe, H. Takeuchi "Effects of ion species in aqueous phase on protein extraction into reversed micellar solution." *Sep. Pur. Technol.* 31 (2003) 251.
57. C. R. Lowe, "Combinatorial approaches to affinity chromatography" *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 248.
58. R. Haeckel, B. Hess, W. Lauterborn, K.-H Wurster, "Purification and allosteric properties of yeast pyruvate kinase" *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 349 (1968) 699.
59. P. Roschlau, B. Hess, "Affinity chromatography of yeast pyruvatekinase with Cibacron blau bound to Sephadex G-200" *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 353 (1972) 441.

60. A. Denizli, E. Piskin, "Dye-ligand affinity systems" *J. Biochem. Biophys. Methods* 49 (2001) 391.
61. J. F. Biellmann, J. P. Samama, C. Braden, H. Eklund, "X-Ray studies of the binding of Cibacron Blue F3Ga to liver alcohol dehydrogenase" *Eur. J. Biochem.* 102 (1979) 107.
62. R. Li, M. A. Bianchet, P. Talalay, L. M. Amzel, "The three-dimensional structure of NAD(P)H:quinone reductase, a flavoprotein involved in cancer chemoprotection and chemotherapy: mechanism of the two-electron reduction" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92 (1995) 8846.
63. A. J. Oakley, M. L. Bello, M. Nuccetelli, A. P. Mazzetti, M. W. Parker, "The ligandin (non-substrate) binding site of human pi class glutathione transferase is located in the electrophile binding site (H-site)" *J. Mol. Biol.* 291 (1999) 913.
64. S. D. Friess, R. Zenobi, "Protein structure information from mass spectrometry? Selective titration of arginine residues by sulfonates" *J. Am. Soc. Mass Spectrom* 12 (2001) 810.
65. B. Salih, R. Zenobi, "MALDI Mass Spectrometry of Dye-Peptide and Dye-Protein Complexes" *Anal. Chem.* 70 (1998) 1536.
66. Y. D. Clonis, N. E. Labrou, V. Ph. Kotsira, C. Mazitsos, S. Melissis, G. Gogolas, "Biomimetic dyes as affinity chromatography tools in enzyme purification" *J. Chromatogr. A* 891 (2000) 33.

67. C. R. Lowe, S. J. Burton, N. P. Burton, W. K. Alderton, J. M. Pitts, J. A. Thomas, “Designer dyes: ‘biomimetic’ ligands for the purification of pharmaceutical proteins by affinity chromatography” *Trends. Biotechnol.* 10 (1992) 442.
68. K. Jones, M. J. Berry, M. D. Scawen, “Affinity chromatography” *Anal. Proc.* 28 (1991) 140.
69. C. Koch, L. Borg, K. Skjodt, G. Houen, “Affinity chromatography of serine proteases on the triazine dye ligand Cibacron Blue F3G-A” *J. Chromatogr. B* 718 (1998) 41.
70. M. Odabasi, A. Denizli, “Cibacron blue F3GA incorporated magnetic poly(2-hydroxyethyl methacrylate) beads for lysozyme adsorption” *J. Appl. Polym. Sci.* 93 (2004) 719.
71. H.-L. Nie, L.-M. Zhu, “Adsorption of papain with Cibacron Blue F3GA carrying chitosan-coated nylon affinity membranes” *Int. J. Biol. Macromol.* 40 (2007) 261.
72. L.-L. Shen, X.-J. Cao, “Synthesis of thermo-sensitive polyacrylamide derivatives for affinity precipitation and its application in purification of lysozyme” *Biochem. Eng. J.* 33 (2007) 66.
73. Y. Liu, X.-Y. Dong, Y. Sun, “Protein separation by affinity extraction with reversed micelles of Span 85 modified with Cibacron Blue F3G-A” *Sep. Purif. Technol.* 53 (2007) 289.

74. Z. Zhelev, M. J. Barratt , L. C. Mahadevan, “Use of reversed-phase high-performance liquid chromatography on polystyrene-divinylbenzene column for the rapid separation and purification of acid-soluble nuclear proteins.” *J. Chromatogr. A* 763 (1997) 65.
75. S. Carda-Broch, A. Berthod, D. W. Armstrong, “Solvent properties of the 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ionic liquid” *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 191.
76. J. Wang, Y. Pei, Y. Zhao, Z. Hu, “Recovery of amino acids by imidazolium based ionic liquids from aqueous media” *Green Chem.* 7 (2005) 196.
77. E. Ermakova, “Lysozyme dimerization: brownian dynamics simulation” *J. Mol. Model.* 12 (2005) 34.
78. S. Zhang, Y. Sun, “A predictive model for salt effects on the dye-ligand affinity adsorption equilibrium of protein” *Ind. Eng. Chem. Res.* 42 (2003) 1235.
79. L. Nanni, A. Lumini, “An ensemble of K-local hyperplanes for predicting protein-protein interactions” *Bioinformatics* 22 (2006) 1207.

