

## 二元双水相体系对欧李种仁清蛋白 及球蛋白的萃取

孙雁霞<sup>1,2</sup>, 时羽杰<sup>1,2</sup>, 罗倩<sup>1,2</sup>, 唐媛<sup>1,2</sup>, 田计均<sup>1,2</sup>, 邬晓勇<sup>1,2</sup>

(1.成都大学药学与生物工程学院,四川成都 610106; 2.农业部杂粮加工重点实验室,四川成都 610106)

**摘要:**为研究二元双水相体系对欧李种仁清蛋白和球蛋白的萃取条件,采用(乙醇+丙酮)(二者体积比为1:2)/硫酸铵构成的二元双水相体系,对欧李种仁的清蛋白和球蛋白分别进行萃取,通过比较2种蛋白在此二元双水相体系中的分配系数、回收率等特性,最终确定欧李种仁清蛋白和球蛋白的最佳萃取条件。实验结果表明:当二元双水相体系组成为27.5%(乙醇+丙酮)(二者体积比为1:2)和26%硫酸铵时,清蛋白的分配系数最小,萃取率达到最大;当二元体系组成为17.5%(乙醇+丙酮)(二者体积比为1:2)和24%硫酸铵时,球蛋白的分配系数最小,萃取率达到最大。二元双水相体系为分离清蛋白与球蛋白提供了新的途径,在植物来源的清蛋白与球蛋白提取中具有良好的应用前景。

**关键词:**生物工程其他学科;二元双水相体系;萃取;球蛋白;清蛋白

**中图分类号:**O652.62;Q512<sup>+</sup>.1;Q512<sup>+</sup>.2 **文献标志码:**A

## Extraction of globulin and albumin from *Cerasus humilis* by binary aqueous two-phase system

SUN Yanxia<sup>1,2</sup>, SHI Yujie<sup>1,2</sup>, LUO Qian<sup>1,2</sup>, TANG Yuan<sup>1,2</sup>, TIAN Jijun<sup>1,2</sup>, WU Xiaoyong<sup>1,2</sup>

(1.College of Pharmacy and Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu, Sichuan 610106, China;2.The Ministry of Agriculture Key Laboratory of Cereal Processing, Chengdu, Sichuan 610106, China)

**Abstract:** In order to optimize the extraction conditions, an binary aqueous two-phase system (BATPS) composed of ethanol and acetone(volume ratio is 1 : 2) and ammonium sulphate is selected to extract globulin and albumin from *Cerasus humilis* seeds. The distribution characteristic of the globulin and albumin in this aqueous two-phase system is reflected by comparing critical data such as partition coefficient and recovery rate. The experiment shows that the optimum conditions of albumin is composed of 27.5% ethanol and acetone (volume ratio is 1 : 2), and 26% ammonium sulphate, the optimum conditions of globulin is composed of 17.5% ethanol and acetone(volume ratio is 1 : 2), and 24% ammonium sulphate. These results suggest that the BATPS is efficient in extracting albumin and globulin with bright application prospect, and has great potential to be

收稿日期:2017-10-30;修回日期:2017-12-06;责任编辑:张士莹

基金项目:四川省高等学校重点实验室开放基金(10Y201409)

第一作者简介:孙雁霞(1976—),女,山西大同人,副教授,博士,主要从事植物源活性蛋白分离与纯化方面的研究。

通信作者:邬晓勇副教授。E-mail:wuxiaoyong@cdu.edu.cn

孙雁霞,时羽杰,罗倩,等.二元双水相体系对欧李种仁清蛋白及球蛋白的萃取[J].河北科技大学学报,2018,39(1):35-41.

SUN Yanxia, SHI Yujie, LUO Qian, et al.Extraction of globulin and albumin from *Cerasus humilis* by binary aqueous two-phase system [J].Journal of Hebei University of Science and Technology,2018,39(1):35-41.

used in natural protein extraction.

**Keywords:** other disciplines of bioengineering; binary aqueous two-phase system (BATPS); extraction; globulin; albumin

清蛋白(又称为白蛋白)与球蛋白是自然界中分布非常广泛的蛋白,几乎存在于所有动植物的体内<sup>[1-3]</sup>。球蛋白因具有免疫作用,所以也将之称为免疫球蛋白。清蛋白能溶于水、稀的酸溶液与碱溶液,同时可以沉淀于饱和硫酸铵溶液中;而球蛋白不溶于水,可溶于稀的盐溶液,能够被半饱和硫酸铵溶液沉淀<sup>[4-5]</sup>。由于清蛋白与球蛋白的功能存在差异,因此在实际生产中需要利用二者理化性质的不同将它们进行分离。球蛋白与清蛋白理化性质的不同导致在双水相体系中分配特性的不同,由此便可以改变二元双水相体系上下相的质量分数,对球蛋白和清蛋白进行分离,并且利于放大进行工业化生产。

近年来,在传统萃取技术基础上发展起来的高分子聚合物双水相萃取体系、表面活性剂双水相体系、小分子有机溶剂双水相萃取体系在分离/富集生物活性物质方面得到了广泛应用<sup>[6-9]</sup>。现有的双水相体系萃取技术大多采用的是一元双水相体系,中国对于二元双水相体系用于蛋白质的研究还比较少<sup>[10-11]</sup>。笔者在一元双水相体系的基础上,利用有机溶剂相似相溶的原理,根据不同种类有机物的特性和优点选取了乙醇和丙酮混合液作为新型二元双水相体系的有机相,构成新型体系对球蛋白和清蛋白进行萃取<sup>[12-14]</sup>。在(乙醇+丙酮)体系中,通过加入硫酸铵形成二元双水相体系,考察了影响双水相形成的因素,重点考察了二元体系的组成对欧李种仁球蛋白和清蛋白分配行为的影响,为二元双水相体系萃取蛋白提供一定的理论基础。

## 1 主要材料

成熟欧李种仁经初步分离得到的清蛋白和球蛋白粗制品。

牛血清蛋白、考马斯亮蓝、无水乙醇、丙酮、硫酸铵等,以上试剂均为分析纯。

紫外分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司提供;电子天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司提供。

## 2 实验方法

### 2.1 欧李种仁球蛋白与清蛋白的制备

选取饱满均匀的成熟欧李种子,按照文献<sup>[15]</sup>的方法,采用碱提酸沉的方法获得总蛋白,之后经过系列操作分别得到欧李种仁的球蛋白和清蛋白粗制品,冷冻干燥后备用。将所得含清蛋白的上清液 A 与含球蛋白的上清液 B 冷藏备用。

### 2.2 双水相萃取方法<sup>[16-19]</sup>

取 5 支刻度管编号。称取一定量乙醇和丙酮的混合液(二者体积比为 1:2)、硫酸铵固体、蛋白稀释液、蒸馏水于刻度管中,充分振荡使成相物质溶解。然后在每支刻度管内加入相应的蛋白稀释液,使双水相体系总质量为 10.00 g,充分振荡后,静置 10 min。两相分离,蛋白质富集于双水相系统的下相中,测定相比  $R$ (见式(1))和蛋白质的含量,并计算分配系数  $K$ (见式(2))及上下相的蛋白回收率  $Y_t$  和  $Y_b$ (见式(3)和式(4))。

$$R = \frac{V_t}{V_b}, \quad (1)$$

式中: $R$  为相比; $V_t$  为上相体积,mL; $V_b$  为下相体积,mL。

$$K = \frac{C_1}{C_2}, \quad (2)$$

式中: $K$  为分配系数; $C_1$  为上相蛋白质量浓度,mg/mL; $C_2$  为下相蛋白质量浓度,mg/mL。

$$Y_t = \frac{C_1 V_t}{(C_1 V_t + C_2 V_b)} \times 100\%, \quad (3)$$

$$Y_b = \frac{C_2 V_b}{(C_1 V_t + C_2 V_b)} \times 100\%, \quad (4)$$

式中: $Y_t$  和  $Y_b$  分别代表上相和下相的蛋白回收率。

### 2.3 球蛋白与清蛋白二元双水相体系的确定<sup>[12,18]</sup>

确定硫酸铵质量分数,改变有机相质量分数,分别计算出有机相质量分数不同的各个体系的分配系数,

选取分配系数最小的体系中的有机相质量分数为最优体系的有机相。

选取分配系数最小的体系中的有机相质量分数且固定,改变硫酸铵质量分数,分别计算出硫酸铵质量分数不同的各个体系的分配系数,选取分配系数最小的体系中的硫酸铵质量分数为最优体系的盐相,由此可确定以上相应的有机相及硫酸铵即为萃取蛋白的最优体系。

### 3 结果与分析

#### 3.1 (乙醇+丙酮)质量分数对欧李种仁球蛋白萃取的影响

在(乙醇+丙酮)/硫酸铵二元双水相体系中,固定硫酸铵质量分数为 24%,与质量分数为 15.0%, 17.5%, 20.0%, 22.5% 和 25.0% 的有机相及相应质量的蒸馏水组成二元双水相体系,使其为体系 A。后于每支刻度管中加入 1 mL 球蛋白稀释液,充分振荡后静置 10 min。待充分萃取后,分别读出上下相体积,且通过紫外分光光度计在 595 nm 处测得上下相溶液的吸光度值,如表 1 所示。

表 1 双水相体系 A 萃取球蛋白数据  
Tab.1 Extraction of globulin from aqueous two-phase system A

| 项目 | 体积/mL |      |      |      |      | 吸光度   |       |       |       |       |
|----|-------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
|    | 1     | 2    | 3    | 4    | 5    | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     |
| 上相 | 0.50  | 0.25 | 3.30 | 3.80 | 4.30 | —     | 0.177 | 0.227 | 0.285 | 0.266 |
| 下相 | 9.48  | 8.00 | 6.80 | 6.70 | 6.70 | 0.417 | 0.460 | 0.587 | 0.606 | 0.607 |

通过表 1 中溶液上下相的体积和吸光度计算出欧李种仁球蛋白在二元双水相体系 1 中的相比、分配系数和回收率,如表 2 所示。

表 2 球蛋白于双水相体系 A 中的  $K, R, Y$  值  
Tab.2 The  $K, R,$  and  $Y$  values of globulin in the aqueous two-phase system A

| 有机相的质量分数/% | $R$   | $K$  | $Y/\%$ |       |
|------------|-------|------|--------|-------|
|            |       |      | $Y_t$  | $Y_b$ |
| 15.0       | 0.053 | —    | —      | —     |
| 17.5       | 0.281 | 34.7 | 8.89   | 91.12 |
| 20.0       | 0.485 | 35.5 | 14.77  | 85.23 |
| 22.5       | 0.567 | 44.6 | 20.17  | 79.83 |
| 25.0       | 0.642 | 41.2 | 20.91  | 79.09 |

对于实验所采用的二元双水相体系来说,希望蛋白质尽可能地分配在下相的硫酸铵溶液中,有机相质量分数对欧李种仁球蛋白分配系数和回收率的影响趋势如图 1 所示。

由图 1 可知,当有机相的质量分数为 17.5% 时,分配系数达到最小,且下相回收率达到最大。由此可确定萃取球蛋白的最佳体系中有有机相的质量分数为 17.5%。

#### 3.2 硫酸铵质量分数对欧李种仁球蛋白萃取的影响

在(乙醇+丙酮)/硫酸铵二元双水相体系中,固定有机相质量分数为 17.5%,与质量分数为 20%, 22%, 24%, 26% 和 28% 的硫酸铵及相应质量的蒸馏水组成二元双水相体系,使其为体系 B。然后于每支刻度管中加入 1 mL 球蛋白稀释液,充分振荡后静置 10 min。待充分萃取后,分别读出上下相体积,且通过紫外分光光度计在 595 nm 处测得上下相溶液的吸光度值,如表 3 所示(当有机相质量分数为 17.5%、硫酸铵质量分

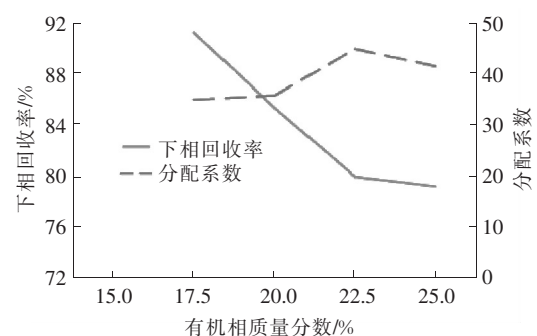


图 1 有机相质量分数对球蛋白分配系数和回收率的影响

Fig.1 Effect of organic mass fraction on globulin partition coefficient and recovery rate

数为 20% 时,加入球蛋白稀释液前双水相体系分层,加入蛋白后体系不再分层)。

表 3 双水相体系 B 萃取球蛋白数据

Tab.3 Extraction of globulin from aqueous two-phase system B

| 项目 | 体积/mL |      |      |      |      | 吸光度 |       |       |       |       |
|----|-------|------|------|------|------|-----|-------|-------|-------|-------|
|    | 1     | 2    | 3    | 4    | 5    | 1   | 2     | 3     | 4     | 5     |
| 上相 | —     | 1.95 | 2.15 | 2.90 | 2.90 | —   | 0.274 | 0.265 | 0.349 | 0.374 |
| 下相 | —     | 8.45 | 8.10 | 7.50 | 7.60 | —   | 0.511 | 0.647 | 0.606 | 0.724 |

通过表 3 中溶液上下相的体积和吸光度,计算出欧李种仁球蛋白在二元双水相体系 B 中的相比、分配系数和回收率,如表 4 所示。硫酸铵质量分数对球蛋白萃取的分配系数和回收率的影响趋势如图 2 所示。

表 4 球蛋白于双水相体系 B 中的  $K, R, Y$  值

Tab.4 The  $K, R,$  and  $Y$  values of globulin in the aqueous two-phase system B

| 硫酸铵的质量分数/% | $R$   | $K$  | $Y/\%$ |       |
|------------|-------|------|--------|-------|
|            |       |      | $Y_t$  | $Y_b$ |
| 20         | —     | —    | —      | —     |
| 22         | 0.231 | 51.0 | 10.54  | 89.46 |
| 24         | 0.367 | 38.4 | 9.25   | 90.75 |
| 26         | 0.387 | 55.6 | 17.70  | 82.30 |
| 28         | 0.382 | 49.8 | 15.96  | 83.56 |

由图 2 可知,当硫酸铵质量分数为 24% 时,分配系数达到最低且下相回收率达到最高。由此可确定该二元双水相体系萃取球蛋白最佳体系的硫酸铵质量分数为 24%。

综上所述,当双水相中有机相质量分数为 17.5%、硫酸铵质量分数为 24% 时,此体系为萃取欧李种仁球蛋白的最佳二元双水相体系。

### 3.3 (乙醇+丙酮)质量分数对欧李种仁清蛋白萃取的影响

在(乙醇+丙酮)/硫酸铵二元双水相体系中,固定硫酸铵质量分数为 24%,与质量分数为 20.0%,22.5%,25.0%,27.5% 和 30.0% 的有机相及相应质量的蒸馏水组成二元双水相体系,使其为体系 C。然后于每支刻度管中加入 1 mL 清蛋白稀释液,充分振荡后静置 10 min。待充分萃取后,分别读出上下相体积,且通过紫外分光光度计在 595 nm 处测得上下相溶液的吸光度值,如表 5 所示。

表 5 双水相体系 C 萃取清蛋白数据

Tab.5 Extraction of albumin from aqueous two-phase system C

| 项目 | 体积/mL |     |     |     |     | 吸光度   |       |       |       |       |
|----|-------|-----|-----|-----|-----|-------|-------|-------|-------|-------|
|    | 1     | 2   | 3   | 4   | 5   | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     |
| 上相 | 3.2   | 3.9 | 4.0 | 4.7 | 5.1 | 0.364 | 0.388 | 0.383 | 0.151 | 0.187 |
| 下相 | 7.3   | 6.5 | 6.5 | 5.8 | 5.4 | 0.660 | 0.670 | 0.748 | 0.559 | 0.568 |

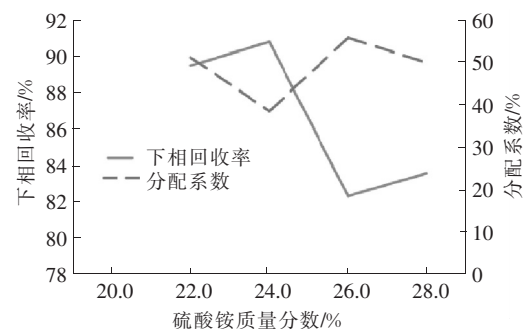


图 2 硫酸铵质量分数对球蛋白分配系数和回收率的影响

Fig.2 Effect of ammonium sulfate fractionation on globulin partition coefficient and recovery rate

通过表 5 中溶液上下相的体积和吸光度计算出欧李种仁清蛋白在二元双水相体系 C 中的相比、分配系数和回收率,如表 6 所示。有机相质量分数对清蛋白萃取的分配系数及下相回收率的影响趋势如图 3 所示。

表 6 清蛋白于双水相体系 C 中的  $K, R, Y$  值

Tab.6 The  $K, R,$  and  $Y$  values of albumin in the aqueous two-phase system C

| 有机相的质量分数/% | $R$   | $K$   | $Y/\%$ |       |
|------------|-------|-------|--------|-------|
|            |       |       | $Y_t$  | $Y_b$ |
| 20.0       | 0.438 | 53.24 | 18.92  | 81.08 |
| 22.5       | 0.600 | 56.14 | 25.20  | 74.80 |
| 25.0       | 0.615 | 49.37 | 23.30  | 76.70 |
| 27.5       | 0.810 | 23.31 | 15.89  | 84.11 |
| 30.0       | 0.944 | 29.58 | 21.84  | 78.16 |

由图 3 可知,当有机相的质量分数为 27.5%时,分配系数最小,且下相的回收率达到最高,所以萃取清蛋白最佳体系的有机相质量分数为 27.5%。

### 3.4 硫酸铵质量分数对欧李种仁清蛋白萃取的影响

在(乙醇+丙酮)/硫酸铵二元双水相体系中,固定有机相质量分数为 27.5%,与质量分数为 20%,22%,24%,26%和 28%的硫酸铵及相应质量的蒸馏水组成二元双水相体系,使其为体系 D。然后于每支刻度管中加入 1 mL 清蛋白稀释液,充分振荡后静置 10 min。待充分萃取后,分别读出上下相体积,且通过紫外分光光度计在 595 nm 处测得上下相溶液的吸光度值,如表 7 所示。

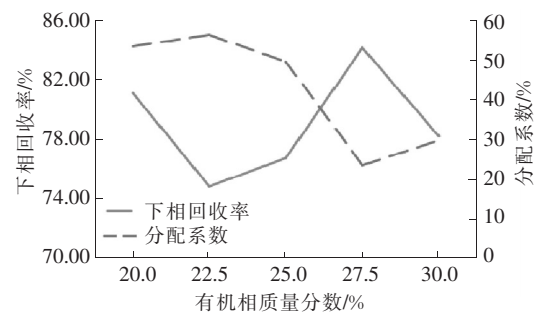


图 3 有机相质量分数对清蛋白分配系数和回收率的影响

Fig.3 Effect of organic mass fraction on albumin partition coefficient and recovery rate

表 7 双水相体系 D 萃取清蛋白数据

Tab.7 Extraction of albumin from aqueous two-phase system D

| 项目 | 体积/mL |     |     |      |     | 吸光度   |       |       |       |       |
|----|-------|-----|-----|------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|
|    | 1     | 2   | 3   | 4    | 5   | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     |
| 上相 | 5.3   | 5.0 | 4.9 | 4.75 | 4.5 | 0.232 | 0.272 | 0.306 | 0.279 | 0.331 |
| 下相 | 5.6   | 5.5 | 5.6 | 6.25 | 6.5 | 0.522 | 0.613 | 0.632 | 0.704 | 0.676 |

通过表 7 中溶液上下相的体积和吸光度计算出欧李种仁清蛋白在二元双水相体系 D 中的相比、分配系数和回收率,如表 8 所示。硫酸铵质量分数对清蛋白萃取的分配系数和下相回收率的影响趋势如图 4 所示。

表 8 清蛋白于双水相体系 D 中的  $K, R, Y$  值

Tab.8 The  $K, R,$  and  $Y$  values of albumin in the aqueous two-phase system D

| 硫酸铵质量分数/% | $R$   | $K$   | $Y/\%$ |       |
|-----------|-------|-------|--------|-------|
|           |       |       | $Y_t$  | $Y_b$ |
| 20        | 0.946 | 41.42 | 28.16  | 71.84 |
| 22        | 0.909 | 41.80 | 27.54  | 72.46 |
| 24        | 0.875 | 46.12 | 28.75  | 71.25 |
| 26        | 0.760 | 37.22 | 22.05  | 77.95 |
| 28        | 0.692 | 46.84 | 24.49  | 75.51 |

由图4可知,当硫酸铵质量分数为26%时,分配系数最小,且下相的回收率达到最高,所以萃取清蛋白最佳体系的硫酸铵质量分数为26%。

综上所述,当双水相中有机相质量分数为27.5%、硫酸铵质量分数为26%时,此体系即为萃取欧李种仁清蛋白的最佳二元双水相体系。

#### 4 结 语

不同蛋白在相同溶剂中的溶解度会有所不同,这是由于理化性质不同造成的<sup>[20]</sup>。清蛋白与球蛋白的理化性质存在较大差异,清蛋白能溶于水,可以沉淀于饱和硫酸铵溶液中。球蛋白的亲水性不如清蛋白,不溶或微溶于水,能溶于稀盐溶液,在半饱和硫酸铵溶液中能够被沉淀,根据理化性质的不同就能对这2种蛋白进行分离。无机盐质量分数不同会导致蛋白质的溶解度有所不同<sup>[21]</sup>,因此相同蛋白质在二元双水相不同体系中的分配系数会有不同,固定其中一相的质量分数,改变另一相的质量分数,选择分配系数最小的相应质量分数作为萃取蛋白质的最优体系。

本实验采用二元双水相体系(乙醇+丙酮)(二者体积比为1:2)/硫酸铵对欧李种仁的球蛋白和清蛋白进行萃取,确定了萃取球蛋白的最佳条件:有机相质量分数为17.5%,硫酸铵质量分数为24%。萃取清蛋白的最佳条件:有机相质量分数为27.5%,硫酸铵质量分数为26%。

本研究利用二元双水相系统对欧李种仁的清蛋白和球蛋白进行了萃取探索,初步获得了2种蛋白最优的萃取条件,为活性蛋白的分离纯化开辟了一条新的途径。本次实验并未对蛋白在此二元双水相系统中的分配行为进行深入探讨,今后应从萃取动力学方面入手进行深入研究,以期获得利用二元双水相萃取蛋白更多的数据,为活性蛋白的分离纯化提供重要的理论依据。

#### 参考文献/References:

- [1] 孙媛,蔡迪,向琴,等.麦麸中四种蛋白的Osborne法提取分离及性能研究[J].食品工业科技,2015,36(9):136-139.  
SUN Yuan, CAI Di, XIANG Qin, et al. Extraction and characterization of four proteins from wheat bran by Osborne [J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(9):136-139.
- [2] 许海波,代红发,李露敏,等.樟树籽仁蛋白的物理性质及安全性的研究[J].食品工业,2016,37(3):200-204.  
XU Haibo, DAI Hongfa, LI Lumin, et al. Physical properties and safety of protein fractions in camphor tree seed [J]. The Food Industry, 2016, 37(3):200-204.
- [3] 赵扬,甄超英,王静.微波改性对大豆分离蛋白膜特性的影响研究[J].河北工业科技,2016,33(2):139-145.  
ZHAO Yang, ZHEN Chaoying, WANG Jing. Effect of microwave modification on the characteristics of soy protein isolate films[J]. Hebei Journal of Industrial Science and Technology, 2016, 33(2):139-145.
- [4] 张霞,王峰.植物蛋白质的特性及应用价值分析[J].现代农业科技,2014(1):289-291.
- [5] 王震,乔天磊,霍乃蕊,等.植物叶蛋白提取及应用前景[J].山西农业科学,2015,43(12):1727-1731.  
WANG Zhen, QIAO Tianlei, HUO Nairui, et al. Extract of leaf protein and its application prospects[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2015, 43(12):1727-1731.
- [6] 李佳,荷兰亭,陈俊,等.双水相体系提取欧李种仁蛋白的初步研究[J].种子,2014,33(3):82-85.  
LI Jia, GOU Lanting, CHEN Jun, et al. Primary study on extraction of seed protein from *Prunus humilis* by aqueous two-phase system [J]. Seed, 2014, 33(3):82-85.
- [7] MALPIEDI L P, NERLI B B, TAQUEDA M E. Optimized extraction of a single-chain variable fragment of antibody by using aqueous micellar two-phase systems[J]. Protein Expression and Purification, 2015, 111(1):53-60.
- [8] AZIZ N F, ABBASILIASI S, NG H S, et al. Purification of  $\beta$ -mannanase derived from *Bacillus subtilis* ATCC 11774 using ionic liquid as adjuvant in aqueous two-phase system[J]. Journal of Chromatography B, 2017, (1055/1056):104-112.
- [9] PRATIWI A I, YOKOUCHI T, MATSUMOTO M, et al. Extraction of succinic acid by aqueous two-phase system using alcohols/salts and ionic liquids/salts[J]. Separation and Purification Technology, 2015, 155(1):127-132.

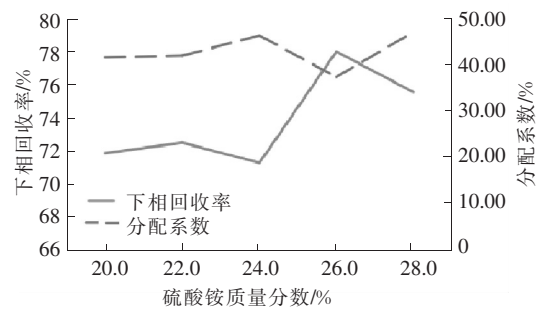


图4 硫酸铵质量分数对清蛋白分配系数和回收率的影响

Fig.4 Effect of ammonium sulfate fractionation on albumin partition coefficient and recovery rate

- [10] FAN Yong, LU Yanmin, YU Bin, et al. Extraction and purification of capsaicin from capsicum oleoresin using an aqueous two-phase system combined with chromatography[J]. Journal of Chromatography B, 2017, 1063:11-17.
- [11] SILVA R M, COIMBRA J S, SILVA C A, et al. Green extraction by aqueous two-phase systems of porcine pancreatic and snake venom phospholipase A2[J]. Separation and Purification Technology, 2015,141:25-30.
- [12] 张喜峰,杨生辉,罗光宏,等.(乙醇+丙酮)/硫酸铵二元双水相萃取分离螺旋藻中 $\beta$ -胡萝卜素[J].天然产物研究与开发,2015,27(3):393-395.  
ZHANG Xifeng, YANG Shenghui, LUO Guanghong, et al. Extraction of  $\beta$ -carotene from spirulina using ethanol and acetone ammonium sulphate aqueous two-phase system[J]. Nat Prod Res Dev, 2015, 27(3): 393-397.
- [13] 彭凌雪,邓江华,柴丽,等.二元双水相体系萃取分离抗细菌的研究进展[J].应用化工,2013,42(7):1312-1314.  
PENG Lingxue, DENG Jianghua, CHAI Li, et al. Research progress of binary aqueous two phase system extraction antibiotics[J]. Applied Chemical Industry, 2013, 42(7): 1312-1314.
- [14] 关卫省,黎文娟,韩娟.醇与离子液体二元双水相体系萃取盐酸多西环素[J].分析测试学报,2012,31(5):600-604.  
GUAN Weisheng, LI Wenjuan, HAN Juan. Extraction of doxycycline hydrochloride using alcohol and ionic liquid binary aqueous two phase system[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2012, 31(5): 600-604.
- [15] 彭凌雪.小分子醇/盐二元双水相体系分离/萃取四环素类抗细菌的研究[D].西安:长安大学,2014.  
PENG Lingxue. Small Molecule Alcohol/Salt Binary Aqueous Two-Phase System Separate/Extract Tetracycline Class of Antibiotics[D]. Xi'an: Chang'an University, 2014.
- [16] 李新华,闫荣.辽西大扁杏仁蛋白的组成及碱法提取工艺的研究[J].食品科学,2009,34(5):132-134.  
LI Xinhua, YAN Rong. Study on composition and extraction of almond protein[J]. Food Science and Technology, 2009, 34(5):132-134.
- [17] 邬晓勇,时羽杰,周治宏,等.2种盐与PEG4000组成的双水相体系及其对BSA萃取的影响[J].宁夏大学学报(自然科学版),2015,36(3):255-260.  
WU Xiaoyong, SHI Yujie, ZHOU Zhihong, et al. A two-phase aqueous system composed of salts and PEG4000 and its effect on BSA extraction [J]. Journal of Ningxia University (Natural Science Edition), 2015, 36 (3): 255-260.
- [18] TAN Zhijian, LI Fenfang, XU Xuelei. Extraction and purification of anthraquinones derivatives from *Aloe vera* L. using alcohol/salt aqueous two-phase system[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2013, 36(8): 1105-1113.
- [19] GLYK A, SOLLE D, SCHEPER T, et al. Optimization of PEG-salt aqueous two-phase systems by design of experiments[J]. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2015, 149(A): 12-21.
- [20] LI Na, WEN Qian, HUANG Yanhua. Development of green Betaine-based deep eutectic solvent aqueous two-phase system for the extraction of protein[J]. Talanta, 2016, 42(1): 23-32.
- [21] NAVAPARA R D, AVHAD D N, RATHOD V K. Application of response surface methodology for optimization of bromelain extraction in aqueous two-phase system[J]. Separation Science and Technology, 2011, 46(11): 1838-1847.