

红毛藻藻蓝蛋白的提取方法研究

(厦门大学生命科学院, 厦门 361005)

郑江

(集美大学生物工程学院, 厦门 361021)

许秀美 王文星 黄水英

摘要 采用多种方法从红毛藻中提取藻蓝蛋白。研究表明,组织捣碎法破碎细胞效率较高,60%饱和度硫酸铵盐析效果好,并确定了最佳的提取工艺线路。

关键词 红毛藻 藻蓝蛋白 提取

Abstract Different methods were tested to extract phycocyanin from the red alga *Bangia fusco-purpurea*. It was proven that tissue-trifurcation method had the highest efficiency for cell fragmentation compared with other methods, and ammonium sulfate at saturation degree of 60% had much better salting-out effect. The best extraction procedure was also obtained.

Key words *Bangia fusco-purpurea*; phycocyanin; extraction

中图分类号: TS254.1 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2003)04-0027-03

藻蓝蛋白是存在于红藻和蓝藻中的一种捕光色素蛋白,可发蓝色荧光。其用途广泛,可以作为天然色素应用于食品中。此外,它还是一种重要的生理活性物质,可制成食品和药品用在医疗保健上^[1]。目前,国际上藻蓝蛋白及标记物的售价相当高,因而,研究和开发藻蓝蛋白是一种具有高经济效益的项目。

根据吸收光谱特性的不同,藻蓝蛋白又可分为藻红蓝蛋白、C-藻蓝蛋白和R-藻蓝蛋白^[2]。细胞实验表明,R-藻蓝蛋白能使B-淋巴细胞增殖,提高肌体

的免疫功能,而C-藻蓝蛋白无此功能^[3]。因而,提取和开发R-藻蓝蛋白,深入研究R-藻蓝蛋白的结构和功能关系,具有重要的理论和现实意义。

红毛藻(*Bangia fusco-purpurea*)属红藻门,红毛菜纲,红毛菜目,是中国东南沿海的特产,有补血降压,滋阴降火和防止血管疾病的作用。研究表明,红毛藻中的藻蓝蛋白为R-藻蓝蛋白^[4],因而,研究和开发红毛藻中的藻蓝蛋白,对其进行科学的提取和加工,不仅能提高红毛藻的经济价值,带动红毛藻养殖业的发展,还会产生良好的经济效益和社会效益。

笔者从细胞破碎、盐析、纯化等几方面研究了红毛藻中藻蓝蛋白的提取方法和提取效果,为开发利用红毛藻提供理论和技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

红毛藻干品 福建莆田南日岛人工养殖;

硫酸铵、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钠、氯化钙、硝酸钠、氢氧化钠、盐酸等试剂 为分析纯,市售; SDS(十二烷基苯磺酸钠) 为化学纯,市售; 国产DEAE-52离子交换树脂, Sephadex G-100葡聚糖凝胶。

Du640蛋白核酸分析仪,组织捣碎机,超声波细胞破碎机, TGL-16高速台式离心机, DK-S26型电热恒温水浴锅, PHS2C型酸度计, FA1004型电子天平,松下电冰箱等。

1.2 实验方法

1.2.1 藻蓝蛋白的提取工艺流程 红毛藻干品→缓冲液浸泡→细胞破碎→离心取上清液→硫酸铵盐析→离心取沉

收稿日期: 2002-09-03

作者简介: 郑江(1971-)男,讲师,研究方向:海藻中活性物质的理论和应用。

基金项目:集美大学校内基金资助(F01023)。

the level of bitterness in protein hydrolysis process. *Chemical Technology and Biotechnology*, 1984(3)

9 Ortiz Sem, Anon Mc. Analysis of Products, Mechanisms of Reaction, and Some Functional Properties of Soy Protein Hydrolysates. *The American Oil Chemists Society*, 2000, 77(12): 1293~1301

10 Netto FM, Galeazzi AM. Production and Characterization of Enzymatic Hydrolysate From Soy Protein Isolate. *Food Sci.*

Technol-Leb, 1998, 31:624~631

11 Jin -Yeol Lee, Hyun Duck Lee, Cheryl -Ho Lee. Characterization of hydrolysates produced by mild - acid treatment and enzymatic hydrolysis of defatted soybean flour. *Food Research International*, 2001(34):217~222

12 Zawa N, Tokuyasu K, et al. Debittering of protein hydrolysates using *Aeromonas caviae* aminopeptidase. *Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45(3)

淀→DEAE-52 离子交换柱层析→较纯的藻蓝蛋白

1.2.2 藻体细胞的破碎 准确称取一定量的红毛藻,加入适量 pH=6.89 的磷酸缓冲溶液,分别用冻融法^[5]、化学试剂法^[6]、溶胀法^[7]、低盐浓度法^[8]、组织捣碎法、超声波法、研磨法等对藻体细胞进行破碎,离心取上层澄清液,即为藻蓝蛋白粗提液。

1.2.3 盐析 用组织捣碎法破碎藻体细胞得到藻蓝蛋白粗提液,分别用饱和度为 10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、100% 的硫酸铵盐析,沉淀后离心,将沉淀物用磷酸缓冲液溶解,得到藻蓝蛋白盐析液。

1.2.4 藻蓝蛋白的纯化 先用 0.0025mol/L 缓冲液平衡 DEAE-52 离子交换柱 (或 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶),再将透析过夜的盐析液上柱,用 0.0025mol/L 的磷酸缓冲液洗脱,最先洗脱出的色带即为纯度较高的 R-藻蓝蛋白。收集该蓝色带,测定其吸收光谱及 280nm、553nm、615nm 下的吸收值。

1.3 测定方法

1.3.1 藻蓝蛋白纯度 用 A_{615}/A_{280} 表示。

1.3.2 藻蓝蛋白得率 按类似文献^[9]方法计算。已知 1% 的 R-藻蓝蛋白在 615nm 处的吸光值为 6600,光程长度为 1cm^[10]。因此根据郎伯-比耳定律,由 615nm 处的吸光度可以计算出藻蓝蛋白的浓度,再乘以稀释倍数及体积,除以红毛藻的质量,即可计算出得率 (当然,由于藻红蛋白在 615nm 处也有一定吸收,故计算结果有一定正误差,但对比较结果影响不大)。

1.3.3 吸收光谱及 A_{615} 、 A_{553} 、 A_{280} 的值 用美国贝克曼-库尔特公司的 Du640 核酸蛋白分析仪测定。

2 结果与讨论

2.1 冻融法的研究

由表 1 的数据可以看出,冻融 3 次,藻体含量约为 1% 时,藻蓝蛋白的得率在 0.99%~1.07% 之间;而当冻融次数增加到 6 次、7 次时,尽管藻体含量只有 0.67%,但藻蓝蛋白得率却增加到 1.45%;相同冻融次数下,不同的冻融时间对得率的影响不大。可见,在冻融法中次数对藻蓝蛋白得率的影响比时间对它

表 1 不同冻融时间、冻融次数下藻蓝蛋白的得率

冻融次数	冻融时间 (h)	冻融体积 (mL)	红毛藻重量 (g)	藻体含量 (%)	得率 (%)
7	1	30	0.2	0.67	1.35
7	2	30	0.2	0.67	1.45
6	3	30	0.2	0.67	1.45
6	4	30	0.2	0.67	1.45
3	2	50	0.5	1.00	1.04
3	4	50	0.5	1.00	1.03
3	6	50	0.5	1.00	0.99
3	10	50	0.5	1.00	1.04
3	12	50	0.5	1.00	1.06
3	18	50	0.5	1.00	1.07
3	24	50	0.5	1.00	1.01

的影响大,多次反复冻融的细胞破碎效果比较好。

冻融法破碎细胞主要是因为藻体在冻结过程中,细胞内外的液态水形成冰晶体,造成体积膨大,对藻体细胞壁和细胞膜产生破坏作用,使其通透性加大,内容物流出。藻体冻结过程中首先是从最容易生成细小冰晶体的地方开始,然后冰晶体逐渐变大,向四周扩展,将距这些地方比较近的细胞壁和细胞膜胀破、压破。每次冻融最容易生成细小冰晶体的地方是不一样的,即在细胞内外形成冰晶的部位是不同的,这样就能对细胞不同部位的细胞壁和细胞膜产生破坏,因而多次冻融能使破碎效果提高。冻融时间增加虽能使冰晶变大,但由于受细胞内外水分含量的限制,冰晶的长大是有限度的,因而对细胞壁和细胞膜破坏只是在原有基础上的破坏,破坏区域较少,效果较差,所以冻融时间对冻融效果影响不大。

2.2 不同细胞破碎方法对藻蓝蛋白提取效果比较

表 2 不同细胞破碎方法下的效果比较

细胞破碎方法	得率 (%)	纯度 (A_{615}/A_{280})	破碎时间 (h)
冻融法 (6 次 4h)	1.45	0.164	24
研磨法	1.43	0.164	1/6
超声波法	1.43	0.165	1/6
组织捣碎法	1.94	0.170	1/6
化学试剂法	2.36	0.176	4
低盐浓度法 (CaCl ₂)	0.868	0.0753	96
(NaNO ₃)	1.56	0.130	96
溶胀法 (10d)	2.29	0.140	240

由表 2 可以看出,用化学试剂法破碎藻体细胞,藻蓝蛋白的得率和纯度最高,但由于化学试剂法操作复杂,浸泡时间长,操作不好易引起藻蓝蛋白变性,在实际操作过程中并不是最理想的方法;溶胀法的得率虽高,但是纯度不高,且需浸泡 10d,提取时间太长,也不理想;组织捣碎法提取得率排在第 3 位,提取液纯度排第 2 位,而提取时间大大缩短,只需 10min,提取效率大大提高,且操作方便,是最适合的方法;冻融法、研磨法、超声波法得率和纯度都基本相同,但都不如组织捣碎法;低盐浓度法则相对而言效果较差。综合考虑各因素,组织捣碎法是提取藻蓝蛋白过程中最合适的细胞破碎方法。

2.3 不同饱和度硫酸铵的盐析效果

由表 3 可知,饱和度在 25% 以下时,没有明显的沉淀,在 25% 以上后,随着硫酸铵饱和度的增加,提取得率逐步升高,当饱和度为 100% 时得率达到最高,为 6.3%。从纯度看,随着饱和度升高,纯度先降后升,在 50% 处有一最低值,分析原因可能是因为随着饱和度的增大,杂蛋白、藻红蛋白、藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白沉淀出的量都在增大,藻蓝蛋白所占的比例减小,所以纯度减小;但当饱和度超过 50% 时,藻蓝

表3 不同饱和度硫酸铵盐析的比较

硫酸铵饱和度(%)	10	20	25	30	35	40	45	50	55	60	70	100
得率(%)	-	-	0.59	0.74	0.72	0.84	1.4	2.6	4.9	5.1	5.3	6.3
纯度(A ₆₁₅ /A ₂₈₀)	-	-	0.21	0.20	0.20	0.18	0.17	0.15	0.16	0.19	0.25	0.26
A ₆₁₅ /A ₆₅₀	-	-	1.09	1.20	1.17	1.15	1.33	1.65	1.98	2.18	1.90	1.99

蛋白所占的比例开始增加,纯度开始升高,到饱和度为100%时纯度达到最高。

研究表明,藻蓝蛋白与藻红蛋白较易分离,而与别藻蓝蛋白较难分离,因而应尽量增加藻蓝蛋白在盐析液中的比例,而尽量减少别藻蓝蛋白的比例。从A₆₁₅/A₆₅₀的比值看,饱和度为60%的比值最高,在此饱和度下藻蓝蛋白与别藻蓝蛋白的比例达到最高。实验中还发现,硫酸铵溶液的饱和度为70%以上时,很容易出现藻胆蛋白沉淀,但是由于硫酸铵溶液的饱和度太大,所出现的藻胆蛋白沉淀都悬浮在上清液的表面,这样很难将沉淀分离,不易操作。综合以上几个方面的因素考虑,虽然当硫酸铵饱和度为60%时,得率和纯度都不是最高,但都还比较高,和饱和度为100%的相差不大,而藻蓝蛋白与别藻蓝蛋白的比例达到最高,特别从操作方面考虑,选取饱和度为60%的硫酸铵盐析,沉淀分离容易,效果好,有利于后期的纯化工作,因而我们选用60%的硫酸铵进行盐析。

盐析后的沉淀用缓冲液溶解后即得藻胆蛋白盐析液,其吸收光谱如图1,在498、564、615nm各有一个吸收峰,前两个主要为藻红蛋白所贡献的吸收峰,后一个主要为藻蓝蛋白所贡献的吸收峰。

2.4 藻蓝蛋白的纯化结果

由表4可见,采用Sephadex G-100葡聚糖凝胶

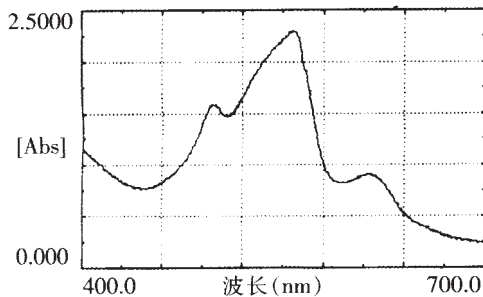


图1 藻蓝蛋白粗提液吸收光谱

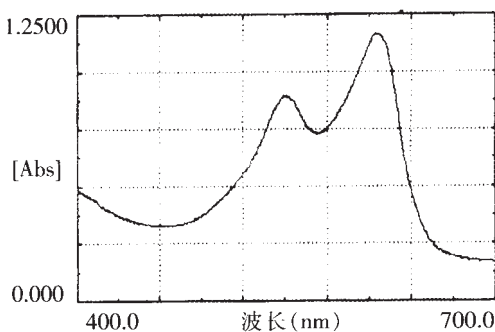


图2 纯化后的藻蓝蛋白吸收光谱

表4 藻蓝蛋白纯化结果

层析柱	Sephadex G-100	DEAE-52
柱长 (cm)	10	36.5
纯度(A ₆₁₅ /A ₂₈₀)	0.72	0.76
纯化时间 (h)	2	5

柱时,长柱的提纯时间较长,但是提纯效果并没有相应的提高很多。而采用DEAE-52离子交换柱进行提纯,不仅提取时间缩短,提取效果也较好,可得到纯度A₆₁₅/A₂₈₀=1.26的蓝色藻蓝蛋白,其紫外可见吸收光谱如图2所示,在615nm和553nm处各有一个吸收峰,为R-藻蓝蛋白的典型特征吸收光谱^[10]。

3 结论

从红毛藻中提取R-藻蓝蛋白,较为理想的细胞破碎方法是组织捣碎法;从红毛藻中提取R-藻蓝蛋白,用饱和度为60%的硫酸铵盐析效果较好;从红毛藻中提取R-藻蓝蛋白,采用DEAE-52离子交换柱纯化效果较好。

从红毛藻中提取R-藻蓝蛋白,较为理想的提取线路为:红毛藻干品→缓冲液浸泡→组织捣碎法破碎细胞→离心取上清液→饱和度为60%的硫酸铵盐析→离心取沉淀→DEAE-52离子交换柱层析→较纯的藻蓝蛋白。

参考文献

- 1 王仲孚,赵谋明,彭志英,等.藻胆蛋白研究.生命的化学,2000,20(2):72~75
- 2 张建平,张景民,赵井泉,等.R-藻蓝蛋白的分离及其结构表征.生物物理学报,1997,13(6):173~178
- 3 曾繁杰,林启山,蒋金丽,等.红藻坛紫菜中R-藻蓝蛋白的分离和特性.生物化学与生物物理学报,1992,24(6):545~552
- 4 曾繁杰.红毛菜藻胆体的分离和蛋白质组成.科学通报,1991,36(18):1410~1413
- 5 彭卫民,商树田,刘国琴,等.钝顶螺旋藻(Sp.-D)藻胆蛋白的提取.食品科学,1999,20(6):48~49
- 6 林红卫,伍正清,黄文榜,等.钝顶螺旋藻中藻蓝蛋白的提取新工艺.广西化工,1997,26(4):5~7
- 7 程凌江,蒋丽金,马金石.条斑紫菜中R-藻红蛋白的纯化及其α和β亚基的分离与发色团含量的测定.海洋与湖沼,1990,21(7):338~341
- 8 韦萍,李环,张成武.极大螺旋藻藻蓝蛋白的提取与纯化.南京化工大学学报,1999,21(5):62~65
- 9 吕彩真,欧光南.红毛菜藻红蛋白的提取及稳定性研究.集美大学学报(自然版),2002,3(7):15~19
- 10 纪明侯.海藻化学.科学出版社,1997.485~506

研究与探讨