

文章编号: 1674 - 5566(2012)03 - 0368 - 06

条斑紫菜藻红蛋白粗提方法比较

蔡春尔, 李春霞, 藤一悦, 林子龙, 顾碧莹, 何培民

(上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 研究了我国主要经济红藻之一条斑紫菜藻红蛋白各种粗提方法。采用“溶胀 + 组织捣碎”法破碎条斑紫菜叶状体细胞, 依次研究活性炭、利凡诺等化学试剂和等电点、溶液浓度、pH、温度、差速离心等物理条件对条斑紫菜破碎液中藻红蛋白纯度和产率的影响。结果显示: 少量活性炭与利凡诺的结合使用不能提高藻红蛋白纯度, 单独使用活性炭, 随用量提高, 其纯度上升, 在活性炭用量是紫菜用量的 1/10 时提纯效果最佳。藻红蛋白等电点沉淀后纯度反而下降, 但 pH 调节与硫酸铵沉淀结合可显著提升纯度, 且与原溶液浓度成正比, 藻红蛋白纯度最高达到 1.35。此外, 盐析过程中差速离心还可继续提升纯度, 达到 1.42, 而通过控制温度来变性蛋白的方法不能达到提纯的效果。实验为进一步改进优化条斑紫菜藻红蛋白粗提做了铺垫。

研究亮点: 以我国主要经济海藻之一条斑紫菜为原料, 首次系统研究多种化学方法(活性炭和利凡诺)和物理方法(等电点、溶液浓度、pH、温度、差速离心)粗提条斑紫菜捣碎液中藻红蛋白的效果, 为藻类色素蛋白质的提取提供一定的参考。

关键词: 条斑紫菜; 藻红蛋白; 活性炭; 利凡诺; 差速离心

中图分类号: Q 819; S 968.43

文献标志码: A

藻胆蛋白包括藻红蛋白(PE)、藻蓝蛋白(PC)和变藻蓝蛋白(APC)等, 是部分藻类的天线色素, 水溶性好, 颜色鲜艳, 且具荧光特性^[1]。条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)是我国最主要的栽培红藻之一, 富含藻红蛋白。多年研究表明, 藻红蛋白用途广泛, 可作为色素添加于食品、化妆品、保健品、药品、纺织品、洗涤剂以及喷泉中^[2-3], 或制成荧光标记探针^[4], 已在 Cyanotech Corporation、Martek Bioscience、PROzyme Inc. 等公司出售, 价格昂贵^[5], 其对人大肠癌、乳腺癌、口腔上皮癌、肝癌等细胞具光动力体外杀伤作用^[6-7]。藻胆蛋白还具抗氧化、抗肿瘤、抗病毒、消炎、护肝、护神经、抗紫外线、减缓动脉硬化、激活表皮生长因子等保健功效^[8-10], 甚至在光学信息存储与处理、快速光电探测、人工神经网络等方面也有潜在的用途^[11-12]。

海藻在生长过程中除了培养条件如营养盐

会影响其藻胆蛋白含量外^[13], 收割后的海藻体的加工方法也会在很大程度上决定其内含物的得失比例^[14-15], 因此处理海藻体的工艺方法在藻胆蛋白制备过程中很值得研究。海藻藻胆蛋白常规制备包括藻体破碎, 蛋白粗提和纯化 3 个步骤^[16], 其它制备方法有免疫吸附法和基因工程法, 免疫吸附法是先制备抗 PC 多克隆抗体, 再用亲和层析纯化 PC^[17]; 基因工程法用寡聚作用、生物特异识别功能域等重组 C-PC^[18], 此外还有一些少量快速制备蛋白用于检测的简单方法^[19-21]。免疫吸附和基因工程等方法成本高, 技术难度大。常规方法使用效果因材而异^[22], 其中纯化阶段成本高, 时间长, 产率低, 是制备的瓶颈。本实验在蛋白粗提阶段深入研究, 从提高粗提效果, 减轻纯化压力的角度, 来探讨藻红蛋白制备方法。

收稿日期: 2011-10-12 修回日期: 2012-01-10

基金项目: 国家高技术研究发展项目(2007AA09Z406); 国家科技支撑计划课题(2012BAC07B03); 上海市教育委员会重点学科建设项目(S30701)

作者简介: 蔡春尔(1980—), 男, 博士, 实验师, 研究方向为海洋生物技术研究。E-mail: cecai@shou.edu.cn

通讯作者: 何培民, E-mail: pmhe@shou.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 材料

条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)叶状体于2009年3月采自江苏省吕泗紫菜栽培海区。藻体用清洁海水洗净,10℃下阴干后,密封置于-20℃冰箱保存备用。

利凡诺购自江西南昌白云药业有限公司;其他试剂均购自国药集团,为分析纯。

高速冷冻离心机(Supra 22k)为Hanil Science公司产品。

紫外分光光度计(Ultrospec2000)为Pharmacia Biotech公司产品。

1.2 活性炭、利凡诺等化学试剂粗提藻红蛋白

称取20 g冻干条斑紫菜,用400 mL 50 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 6.8,含1 mmol/L EDTA,10 mg溶菌酶)浸泡过夜,捣碎,4℃在10 000 r/min离心下20 min,取上清。

1.2.1 活性炭与利凡诺正交实验

取1.2中制备的上清150 mL,分成5组,每组30 mL,分别加入2、1.5、1、0.5、0 mg活性炭,4℃放置4 h,纱布过滤,离心取上清。将每组上清各取20 mL,平均分装成5管,每管加入1.6、1.2、0.8、0.4、0 mL的0.1%利凡诺试剂溶液,4℃放置4 h,离心取上清。

1.2.2 活性炭单因素实验

取1.2中制备的上清108 mL,分成2个平行组,每组设9个梯度,分别加入300、240、120、60、30、24、12、6、0 mg活性炭,4℃放置4 h,纱布过滤,离心取上清。

1.3 pH、温度等物理方法粗提藻红蛋白

称取200 g冻干条斑紫菜,用1 L磷酸盐缓冲液浸泡,过夜,捣碎,离心取上清。

1.3.1 等电点梯度

取1.3中制备的上清120 mL,分成6组,每组20 mL,分别调节pH至3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4,静置3 h,离心,沉淀用适量50 mmol/L磷酸盐缓冲液溶解,上清和沉淀分别扫描吸收光谱。

1.3.2 浓度梯度

取1.3中制备的上清,倍比稀释,即用50 mmol/L磷酸盐缓冲液分别稀释至原溶液的1/2、1/4、1/8、1/16、1/32,连同原液共6组,每组13.5 mL,均加至45%硫酸铵饱和度,调节pH至6.8,

静置2 h,离心取沉淀,用5 mL磷酸盐缓冲液溶解,测量吸光值。

1.3.3 pH 梯度

取1.3中制备的上清90 mL,分成6组,每组15 mL,均加至45%硫酸铵饱和度,调pH至10.3、9.8、9.3、8.8、8.3、7.8、7.3、6.8、6.3、5.8、5.3、4.8,静置2 h,离心取沉淀,用5 mL 50 mmol/L磷酸盐缓冲液溶解,测吸光值。

1.3.4 温度梯度

取1.3中制备的部分上清加至45%硫酸铵饱和度,离心后沉淀用缓冲液溶解。量取30 mL溶解液,分装成10管,于25℃、30℃、35℃、40℃和45℃下分别放置15 min和30 min,离心取上清,测吸光值。

1.3.5 差速离心梯度

取1.3中制备的上清30 mL,分成2个平行组,每组15 mL,均加至45%硫酸铵饱和度,调pH至6.8,静置过夜,均分别用1 000、3 000、5 000、7 000、9 000和11 000 r/min在4℃下依次离心取沉淀,用5 mL缓冲液溶解,测吸光值。

1.4 蛋白纯度与含量计算方法

藻红蛋白吸收光谱纯度计算参考SIEGELMAN等的方法^[23]。藻红蛋白含量计算参考高洪峰的方法^[24]。

2 结果

2.1 活性炭与利凡诺正交效果

破碎液用活性炭与利凡诺共同处理后,溶液中PE纯度变化在0.20~0.50之间,与原液纯度(0.45)相比效果不明显。经F检验,不同质量活性炭处理对纯度影响无显著性差异,经q检验($\alpha=0.05$),不同含量利凡诺处理对纯度影响具显著性差异,只有0.4 mL与0 mL(即对照组)两组无显著性差异(图1)。

2.2 活性炭单因素效果

破碎液单独用活性炭处理后,溶液中PE纯度随活性炭量增加先降后升,在30 mg处理量时达到与处理前同样纯度,此后纯度逐渐上升,且每组结果经q检验($\alpha=0.05$)均与前后有显著性差异。产率变化差异很大,在120 mg处理量时最高,该最高值与对照组,60 mg和240 mg结果经q检验($\alpha=0.05$)无显著性差异,因此理想处理量为60 mg活性炭(图2)。

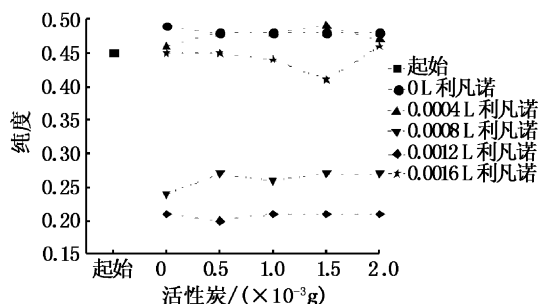


图1 活性炭与利凡诺共同处理对条斑紫菜破碎液中藻红蛋白纯度的影响

Fig.1 Purity of phycoerythrin from *Porphyra yezoensis* crude extract after being treated with combining of activated carbon and rivanol

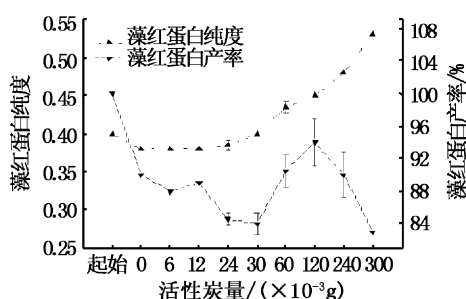


图2 活性炭处理对条斑紫菜破碎液中藻红蛋白纯度的影响

Fig.2 Purity of phycoerythrin from *Porphyra yezoensis* crude extract after being treated with activated carbon

2.3 等电点梯度效果

等电点梯度沉淀后,沉淀和上清中藻红蛋白纯度均有下降,溶液中最高纯度出现在 pH 为 4.2 和 4.4 时,均为 0.41,沉淀中最高纯度出现在 pH 为 4.1 时,也为 0.41(图 3)。

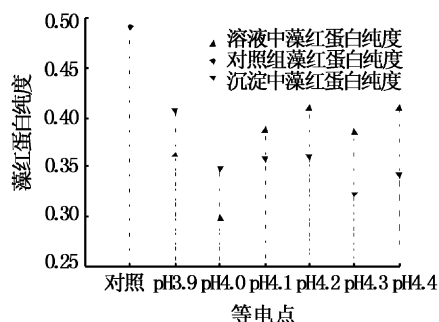


图3 等电点沉淀对条斑紫菜藻红蛋白粗提液纯度的影响

Fig.3 Purity of phycoerythrin from *Porphyra yezoensis* crude extract after being treated with isoelectric precipitation

2.4 浓度梯度效果

盐析所得藻红蛋白纯度和产率随盐析前溶液浓度降低而降低,未稀释溶液盐析后纯度为 1.35,得率为 81.7%(图 4)。

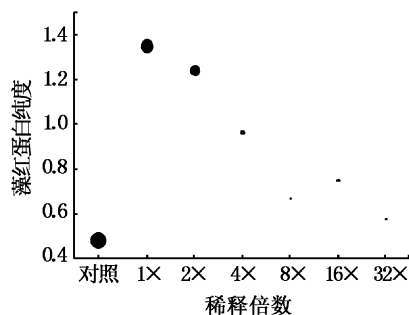


图4 不同溶液浓度对条斑紫菜藻红蛋白粗提液硫酸铵盐析纯度的影响

Fig.4 Purity of phycoerythrin from *Porphyra yezoensis* in different concentration of crude extract after ammonia sulphate precipitation

●圆点大小代表藻红蛋白产率,纵坐标值代表藻红蛋白纯度。

2.5 pH 梯度

在不同的 pH 下盐析,藻红蛋白纯度大致呈抛物线变化,最高值出现在 pH 6.8,为 1.35(图 5)。

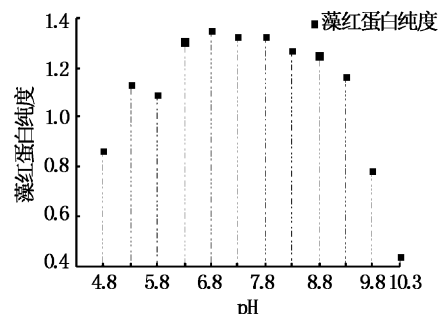


图5 不同 pH 对条斑紫菜藻红蛋白粗提液硫酸铵盐析纯度的影响

Fig.5 Purity of phycoerythrin from *Porphyra yezoensis* crude extract after ammonia sulphate precipitation in different pH conditions

2.6 温度梯度

藻红蛋白盐析液经不同温度处理后,纯度反而下降,且与温升成反比(图 6)。

2.7 差速离心梯度

硫酸铵沉淀后,通过不同转速可把不同纯度的藻红蛋白分离。低转速可得到较高纯度的藻红蛋白,最高达到 1.42,但得率有所损失(图 7)。

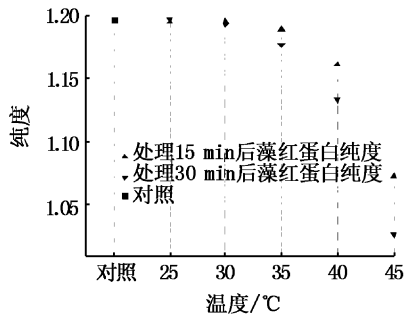


图6 不同温度对条斑紫菜藻红蛋白粗提液纯度的影响

Fig. 6 Purity of phycoerythrin from *Porphyra yezoensis* crude extract after dealing with different temperature conditions

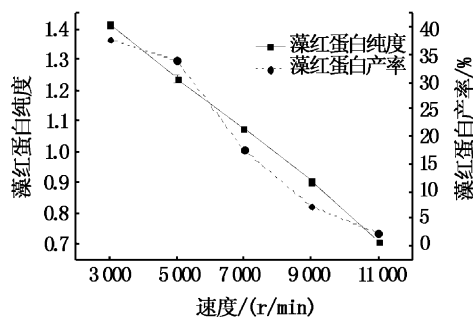


图7 差速离心对条斑紫菜藻红蛋白粗提液纯度的影响

Fig. 7 Purity of phycoerythrin from *Porphyra yezoensis* crude extract after dealing with differential centrifugation

3 讨论

条斑紫菜藻红蛋白粗提最常用的试剂是硫酸铵^[5],但应用于其他藻胆蛋白的沉淀剂还有丙酮、活性炭和利凡诺等。丙酮用于螺旋藻藻胆蛋白特殊处理^[25-26],活性炭是良好的吸附剂可去除水中的毒素和重金属,但其对藻胆蛋白的作用效果尚无报道,本实验显示活性炭的使用可部分提高条斑紫菜破碎液中藻红蛋白的纯度,但其强力吸附作用会使蛋白得率有所下降。利凡诺在纯化藻红蛋白中的使用更为广泛,可沉淀 *Porphyridium cruentum*^[27] 和 *Nostoc* sp.^[28] 的藻胆蛋白,经过分步沉淀,甚至能获得高纯度的 *Spirulina (Arthrospira) fusiformis* CPC(3.90)^[29] 和 *Arthonema africanum* CPC(3.00)^[30]。可本实验中尽管设置了广泛的利凡诺梯度,却使藻红纯度有降无升,这与 *Porphyridium cruentum* 中描述现

象相反,表明利凡诺法不适合条斑紫菜藻红蛋白粗提。

汤朝辉等将钝顶螺旋藻破碎液的 pH 调至 3.5,经搅拌、离心得到了天蓝色的藻胆蛋白膏^[31]。本文实验显示藻红蛋白确实对 pH 敏感,但单独通过等电点沉淀无法提纯,而在硫酸铵盐析过程中辅以 pH 调节才能获得高的纯度和产率。

笔者以往研究中对条斑紫菜设置了 1:40, 1:20, 1:10, 1:5 (g/mL) 四个物液比梯度,虽然在 1:40 时藻红蛋白的产率显著增高,但由此导致粗提过程中会消耗更多的硫酸铵和缓冲液,并增加仪器投入和人力成本,故非最佳选择,而采用物液比 1:5 相对在成本核算和纯度上有一定优势^[32]。本文中设置的盐析物液比 (g/mL) 梯度为 1:5, 1:10, ..., 1:160, 结果显示 1:5 时的 45% 盐析纯度和产率远高于其它组,与之前研究结果一致。

参考文献:

- [1] LIU L N, CHEN X L, ZHANG X Y, et al. One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata* [J]. Journal of Biotechnology, 2005, 116(1): 91-100.
- [2] DUFOSSÉA L, GALAUPA P, YARONB A, et al. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? [J]. Trends in Food Science & Technology, 2005, 16(9): 389-406.
- [3] SANTIAGO-SANTOS M C, PONCE-NOYOLA T, OLVERA-RAMIREZ R, et al. Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp. [J]. Process Biochemistry, 2004, 39(12): 2047-2052.
- [4] KRONICK M N, GROSSMAN P D. Immunoassay techniques with fluorescent phycobiliprotein conjugates [J]. Clinical Chemistry, 1983, 29(9): 1582-1586.
- [5] SEKAR S, CHANDRAMOHAN M. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization [J]. Journal of Applied Phycology, 2008, 20(2): 113-136.
- [6] 蔡心涵, 何立明. 螺旋藻藻蓝蛋白对癌激光疗法增敏作用的实验研究 [J]. 中国海洋药物, 1995, 14(1): 15-18.
- [7] 李冠武, 王广策, 陆雷, 等. 多管藻 R-藻红蛋白的激光光敏作用对体外培养的肿瘤细胞生存率的影响 [J]. 激光生物学报, 1997, 6(3): 1119-1121.
- [8] BENEDETTI S, BENVENUTI F, PAGLIARANI S, et al. Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-Aquae* [J]. Life

- Sciences, 2004, 75 (19): 2353 - 2362.
- [9] NAGAOKA S, SHIMIZU K, KANEKO H, et al. A novel protein C-phycoerythrin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of *Spirulina platensis* Concentrate in rats [J]. The Journal of Nutrition, 2005, 135 (10): 2425 - 2430.
- [10] SHIH C M, CHENG S N, WONG C S, et al. Antiinflammatory and antihyperalgesic activity of C-phycoerythrin [J]. Anesthesia and Analgesia, 2009, 108(4): 1303 - 1310.
- [11] BURROWS S M, PATEL P, PAPPAS D. Light tolerance of R-phycoerythrin and a tandem conjugate observed by single molecule recrossing events [J]. Applied Spectroscopy, 2009, 63(6): 709 - 715.
- [12] WOMICK J M, MORAN A M. Nature of excited states and relaxation mechanisms in C-phycoerythrin [J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2009, 113(48): 15771 - 15782.
- [13] 孟庆俊, 林少珍, 项彬彬, 等. 营养盐可得性对坛紫菜氮磷吸收、生长及藻红蛋白含量的影响 [J]. 上海海洋大学学报, 2010, 19(2): 214 - 218.
- [14] 张维特, 时旭, 欧杰, 等. 酸法水解绿潮藻生物质及发酵制乙醇的效果 [J]. 上海海洋大学学报, 2011, 20(1): 131 - 136.
- [15] 吴晓萍, 廖艳, 章超桦, 等. 柠檬酸和琥珀酸提取牡蛎匀浆液中镉的研究 [J]. 上海海洋大学学报, 2011, 20(3): 462 - 467.
- [16] SUN L, WANG S, GONG X, et al. Isolation, purification and characteristics of R-phycoerythrin from a marine macroalga *Heterosiphonia japonica* [J]. Protein Expression and Purification, 2009, 64(2): 146 - 154.
- [17] KEILLER D R, WHITELAM G C, SMITH H. Polyclonal antibodies raised to phycocyanins contain components specific for the red-absorbing form of phytochrome [J]. Planta, 1988, 176(3): 391 - 398.
- [18] CAI Y A, MURPHY J T, WEDEMAYER G J, et al. Recombinant phycobiliproteins: recombinant C-phycoerythrin equipped with affinity tags, oligomerization, and biospecific recognition domains [J]. Analytical Biochemistry, 2001, 290(2): 186 - 204.
- [19] ŠTASTNÁM, RADKO S, CHRAMBACH A. Separation efficiency in protein zone electrophoresis performed in capillaries of different diameters [J]. Electrophoresis, 2000, 21(5): 985 - 992.
- [20] VISKARI P J, COLYER C L. Separation and quantitation of phycobiliproteins using phytic acid in capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection [J]. Journal of Chromatography A, 2002, 972(2): 269 - 276.
- [21] VISKARIA P J, COLYER C L. Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples [J]. Analytical Biochemistry, 2003, 319(2): 263 - 271.
- [22] RANJITHA K, KAUSHIK B D. Purification of phycobiliproteins from *Nostoc muscorum* [J]. Journal of Scientific and Industrial Research, 2005, 64(5): 372 - 375.
- [23] SIEGELMAN H, KYCIA J. Algal biliproteins: handbook of phycological methods, physiological and biochemical methods [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1978: 71 - 79.
- [24] 高洪峰. 不同生长期坛紫菜中藻胆蛋白的含量变化 [J]. 海洋与湖沼, 1993, 24(6): 645 - 648.
- [25] COHEN Z, REUNGJITCHACHAWALI M, SIANGDUNG W, et al. Production and partial purification of γ -linolenic acid and some pigments from *Spirulina platensis* [J]. Journal of Applied Phycology, 1993, 5(1): 109 - 115.
- [26] REISA A, MENDES B A, LOBO-FERNANDESA H, et al. Production, extraction and purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp. [J]. Bioresource Technology, 1998, 66(3): 181 - 187.
- [27] TCHERUOV A A, MINKOVA K M, GEORGIEV D I, et al. Method for B-phycoerythrin purification from *Porphyridium cruentum* [J]. Biotechnology Techniques, 1993, 7(12): 853 - 858.
- [28] TCHERNOVA A A, MINKOVAB K M, HOUBAVENSKAB N B, et al. Purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp. by aminohexyl-sepharose chromatography [J]. Journal of Biotechnology, 1999, 69(1): 69 - 73.
- [29] MINKOVA K M, TCHERNOV A A, TCHORBADJIEVA M I, et al. Purification of C-phycoerythrin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis* [J]. Journal of Biotechnology, 2003, 102(1): 55 - 59.
- [30] MINKOVA K, TCHORBADJIEVA M, TCHERNOV A, et al. Improved procedure for separation and purification of *Arthrospira africanum* phycobiliproteins [J]. Biotechnology Letters, 2007, 29(4): 647 - 651.
- [31] 汤朝晖, 蒋加伦. 钝顶螺旋藻藻胆蛋白的提取及其特征初报 [J]. 海洋学研究, 1993, 11(4): 49 - 54.
- [32] 蔡春尔, 周铭, 李春霞, 等. 条斑紫菜藻胆蛋白提纯方法优化探索 [J]. 生物技术通报, 2009(2): 98 - 102.

Comparison of crude extraction methods of phycoerythrin from *Porphyra yezoensis*

CAI Chun-er, LI Chun-xia, TENG Yi-yue, LIN Zi-long, GU Bi-ying, HE Pei-min
(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: We compared the methods of crude phycoerythrin extraction from *Porphyra yezoensis*, a main economic red alga in China. *Porphyra yezoensis* thallus was broken with “swelling & smash” method, and crude extract was dealt in sequence with chemical reagent such as activated carbon, rivanol or physical condition such as isoelectric point, concentration, pH, temperature and differential centrifugation. It showed that the purity of phycoerythrin increased when activated carbon was heavily applied alone. When usage of activated carbon achieved two percent of that of *Porphyra*, the effect was best. And this method was much better than combined using of activated carbon and rivanol on a small scale. On the other hand, ammonium sulfate precipitation combined with pH regulating increased the purity, which was in line with concentration of solution and arrived at topmost purity of 1.35, which achieved 1.42 after differential centrifugation followed. While isoelectric precipitation or temperature control decreased the purity. This research laid the groundwork for preparation of phycoerythrin from *Porphyra yezoensis*.

Key words: *Porphyra yezoensis*; phycoerythrin; activated carbon; rivanol; differential centrifugation