

紫菜中藻胆蛋白的提取及纯化

杨方美, 李华佳, 胡秋辉
(南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095)

摘 要: 紫菜经 800W 功率超声波作用 800s, 用 30 倍体积的水浸提得到藻胆蛋白的粗提物, 再用饱和度为 45% 的硫酸铵盐析沉淀及透析后, 经羟基磷灰石(HA)层析柱, 用不同浓度的磷酸缓冲液梯度洗脱, 可分离纯化出紫菜藻胆蛋白(含藻红蛋白和藻蓝蛋白), 两种活性组分的纯度($A_{\max}/A_{280\text{nm}}$)达到 4.32。藻红蛋白的最大吸收峰在 558nm, 藻蓝蛋白的最大吸收峰在 616nm。

关键词: 紫菜; 藻胆蛋白; 提取; 纯化

Extraction Technology of Phycobiliprotein Derived from Laver

YANG Fang-mei, LI Hua-jia, HU Qiu-hui

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Laver was broken by ultrasonication at 800W for 800s and extracted with deionized-water at 30 volumes. The crude phycobiliprotein including phycoerythrin and phycocyanin was purified by precipitating with ammonium sulphate of 45% and dialyzing. The two active fraction were received by hydroxylapatite(HA) column chromatography. The purities of phycobiliprotein was up to 4.32. The phycoerythrin and phycocyanin exhibited maximum absorption at 558nm and 616nm respectively.

Key words: laver; phycobiliprotein; extraction; purification

中图分类号: S93

文献标识码 A

文章编号: 1002-6630(2005)11-0100-04

藻胆蛋白是藻类藻胆体中的捕光色素蛋白, 能把捕获的光能高效的传递给叶绿素, 从而使海藻的光合作用得以发生。藻胆蛋白主要包括藻蓝蛋白(Phycocyanin)、藻红蛋白(Phycoerythrin)和别藻蓝蛋白(Allophycocyanin)三类^[1], 其中藻蓝蛋白(PC)和藻红蛋白(PE)在藻体中的含量较为丰富。藻胆蛋白在藻类中的含量可以达到细胞干重的 25%~28%^[2]。

藻胆蛋白是一种非常重要的光动力药物的原料, 特有的光敏效应可辅助激光治癌, 在病灶部位富集, 吸收光后高效产生自由基和活泼态氧, 从而实现对肿瘤细胞的杀伤。有光毒性而没有暗毒性, 在人体内代谢快^[3,4]。藻胆蛋白还具有抗氧化清除自由基和提高免疫力的功效^[2]^[5]。其制作的免疫荧光标记抗体, 检测灵敏度远远高于传统的荧光标记物, 可用于特殊分子定位和重要分子检测, 包括 SARS 病毒的免疫分子检测, 能准确地诊断肿瘤、确定病变部位和病情轻重程度等^[6~8]。藻胆蛋白可作为功能因子用于保健食品和功能食品及特殊饲料^[9],

同时还是理想的天然色素, 可大量用于食品工业和化妆品工业等, 无毒副作用, 是安全的添加剂^[10]。

目前我国对藻类开发利用的力度和深度还很小, 大部分仅限于简单的食用, 出口产品也只限于粗制品, 还未应用高科技进行深层次的加工和利用。而藻类的一些高科技深加工产品则主要依靠进口, 作为药物使用价格十分昂贵。目前藻红蛋白的生产基本由美国 Sigma 公司的垄断, 国内有以红毛菜、紫球藻和螺旋藻作为原料提取藻红蛋白的报导, 但仍处于研究阶段, 未有成品进入市场销售。

我国海域宽广, 藻类资源十分丰富, 是世界上最大的紫菜生产大国, 我国养殖和加工又主要集中在江苏沿海, 其产量占全国的 95% 以上。江苏省如东县条斑紫菜生产量占全国总量的 50%。紫菜的市场价格是红毛菜的 1/10, 小球藻和螺旋藻的 1/3。选用紫菜提取藻胆蛋白, 具有成本低, 得率高的优点。紫菜中的藻胆蛋白其大部分主要是藻红蛋白(PE), 本实验采用超声波破

收稿日期: 2005-09-18

基金项目: 江苏省高技术研究计划资助项目(BG2003318)

作者简介: 杨方美(1963-), 女, 副教授, 研究方向为食品工程。

碎, 硫酸铵沉淀和羟基磷灰石(HA)柱层析相结合的方法, 以期找出从紫菜中分离提纯藻胆蛋白(主要是藻红蛋白)的最佳参数条件, 分离纯化得到较纯的藻胆蛋白。

1 材料与方法

1.1 材料

紫菜为产自浙江舟山的野生紫菜; 羟基磷灰石(HA)由上海维编公司生产。

1.2 实验方法

1.2.1 藻胆蛋白提取工艺(图 1)

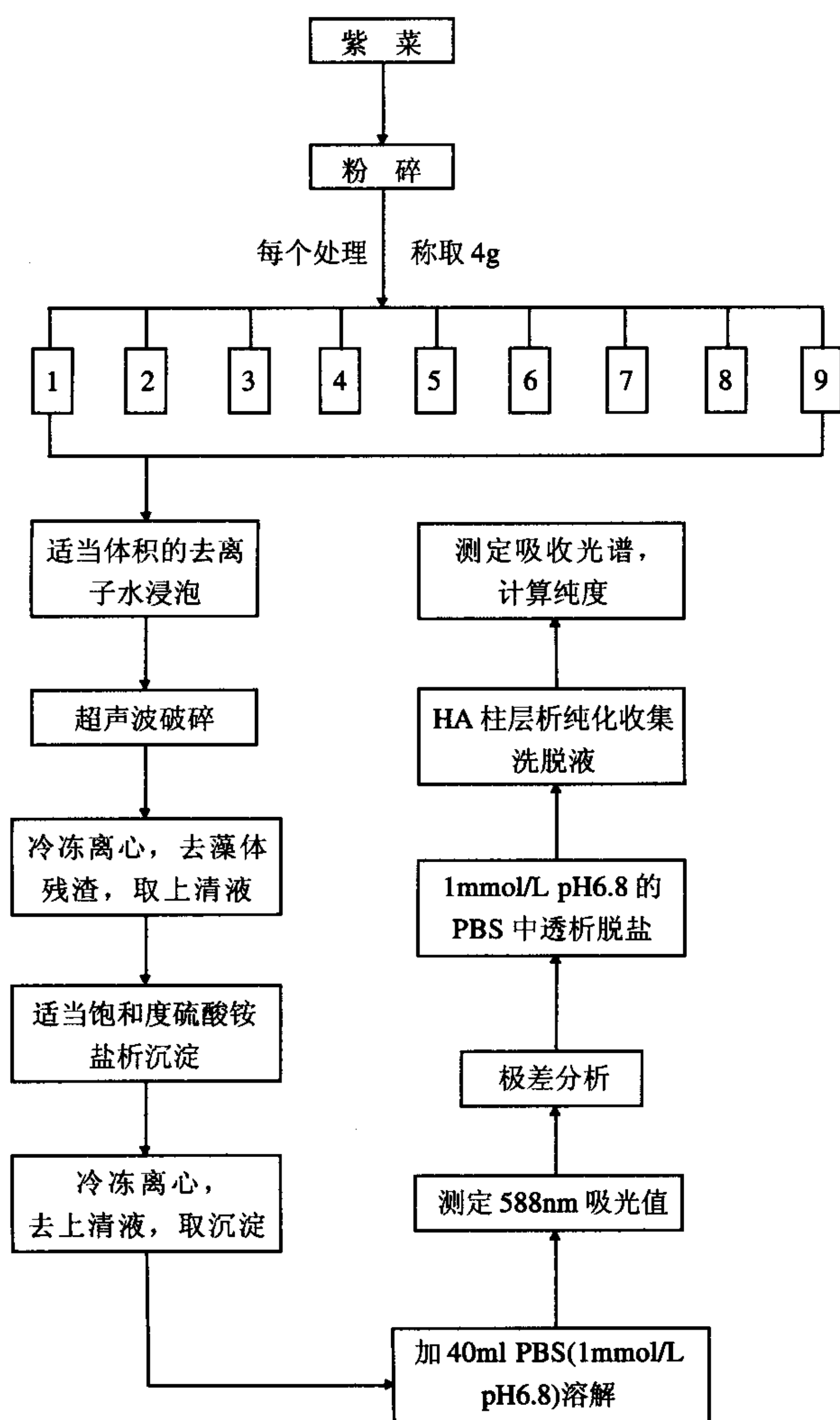


图 1 藻胆蛋白提取工艺路线

Fig.1 The scheme of Phycobiliprotein extraction

1.2.2 藻胆蛋白初提物的制备

称取 4g 紫菜粉, 用去离子水浸泡 4h, 充分溶胀。在冰浴中进行超声波破碎, 防止温度过高使蛋白变性, 工作时间为 5s, 间歇时间为 10s^[11,12], 10 次为一个循, 出散热 1min。放在冰箱中过夜。在 4℃下 7000r/min 离心 10min, 去除藻体残渣, 取紫红色上清液即为藻胆蛋

白初提物。量取上清液体积, 计算并称量相应饱和度和质量的固体硫酸铵粉末(经用研钵磨细), 边搅拌边缓慢加入初提液中, 缓慢搅拌 1h 以促进蛋白沉淀。冷冻离心(4℃, 10000r/min, 10min), 将沉淀溶于 40ml, 1mmol/L 磷酸缓冲液(pH6.8)中。用紫外分光光度计测定其吸收光谱。

本实验设计了一个 $L_9(3^4)$ 的正交实验来寻求藻胆蛋白提取过程中的最佳条件参数(见表 1)。藻胆蛋白是水溶性蛋白, 用去离子水浸提。

表 1 影响藻胆蛋白提取的因素及水平设计

Table 1 The design of factors and the level in the Phycobiliprotein extraction

水平 设定	影响因素			
	提取液体积 A (倍数/ml)	超声波功率 B (W)	超声波时间 C (s)	(NH ₄) ₂ SO ₄ 饱和度 D (%)
I	20/80	600	400	45
II	30/120	800	600	55
III	40/160	1000	800	65

将最佳提取条件所作处理得到的紫红色蛋白溶液于 4℃冰箱中, 置于 1mmol/L 磷酸缓冲液(pH6.8)中透析 40h^[13], 脱盐。期间每隔 4h 更换一次透析液。

1.2.3 羟基磷灰石(HA)柱层析纯化藻胆蛋白

先将羟基磷灰石粉末用 pH6.8 的 1mmol/L 磷酸缓冲液浸泡, 用湿装法装柱(2.5cm × 4cm), 再用 3 倍体积的 pH6.8 的磷酸缓冲液流过固定相, 使其达到平衡^[14]。

上样量为 2ml, 用梯度离子浓度的 pH6.8 的磷酸缓冲液(分别为 10、20、50、100、200mmol/L, 并加入 0.1mol/L NaCl)梯度洗脱, 洗脱速度为 4.5ml/h, 分步收集洗脱液, 每管 4ml, 立即测定 A_{280nm} 值, 当 $A_{280nm} \leq 0.02$ 时, 更换离子浓度较高的缓冲液洗脱^[15~19]。

2 结果与分析

2.1 初提取条件的筛选及优化

表 2 中可以看出, 因素 D, 即 (NH₄)₂SO₄ 饱和度对提取效果的影响最大, 其 R 值为 3.756, 其他三个因素对提取效果的影响则相差不大, 影响程度为 A(提取液体积) > B(超声波功率) > C(超声波时间)。在各水平的比较中, 可以看出硫酸铵浓度增大, A_{558nm} 值是减小的, 因为 A_{558nm} 值只是反映了藻红蛋白的含量, 和其他蛋白质的含量并无关系, 可见随着硫酸铵浓度的增加, 所沉淀下来的并不是目的蛋白, 而是其他杂蛋白。随着超声波的功率和提取液的体积增大, 提取液中藻红蛋白的含量也增大, 但这两个因素增加到一定程度后, 对提取效果的作用就不再明显。而随着超声波时间的延长, 提取效果是有显著升高的。由正交实验得出的最佳提取条件参数为在 30 倍体积的提取液(A)中, 800W(B)的功率下超声波破碎 800s(C), 用 45% 饱和浓度的硫酸铵(D)盐析沉淀。

表2 提取条件对提取效果的影响
Table 2 Effect of the extract condition on purity of Phycobiliprotein

处理	提取液 体积 A	超声波 功率 B	超声波 时间 C	(NH ₄) ₂ SO ₄ 饱和度 D	A _{558nm}
1	I	I	I	I	0.475
2	I	II	II	II	0.721
3	I	III	III	III	0.051
4	II	I	II	III	0.027
5	II	II	III	I	2.346
6	II	III	I	II	0.576
7	III	I	III	II	0.858
8	III	II	I	III	0.395
9	III	III	II	I	1.652
T ₁	1.238	1.604	1.446	4.473	
T ₂	3.193	3.453	2.635	2.146	
T ₃	2.905	2.279	3.255	0.717	
R	1.955	1.849	1.809	3.756	

2.2 藻胆蛋白的纯化

将2ml 藻胆蛋白初提液上羟基磷灰石柱层析纯化。

藻胆蛋白的 HA 柱层析洗脱曲线见图2所示, 可以看到收集液在280nm处有明显的吸收峰, 且洗脱液带有明显的紫红色, 此时的洗脱液离子强度为200mmol/L。其他收集液在280nm处表现出较小的吸收峰, 是在低离子浓度下洗脱下来的一些杂蛋白, 在可见光处无吸收峰。

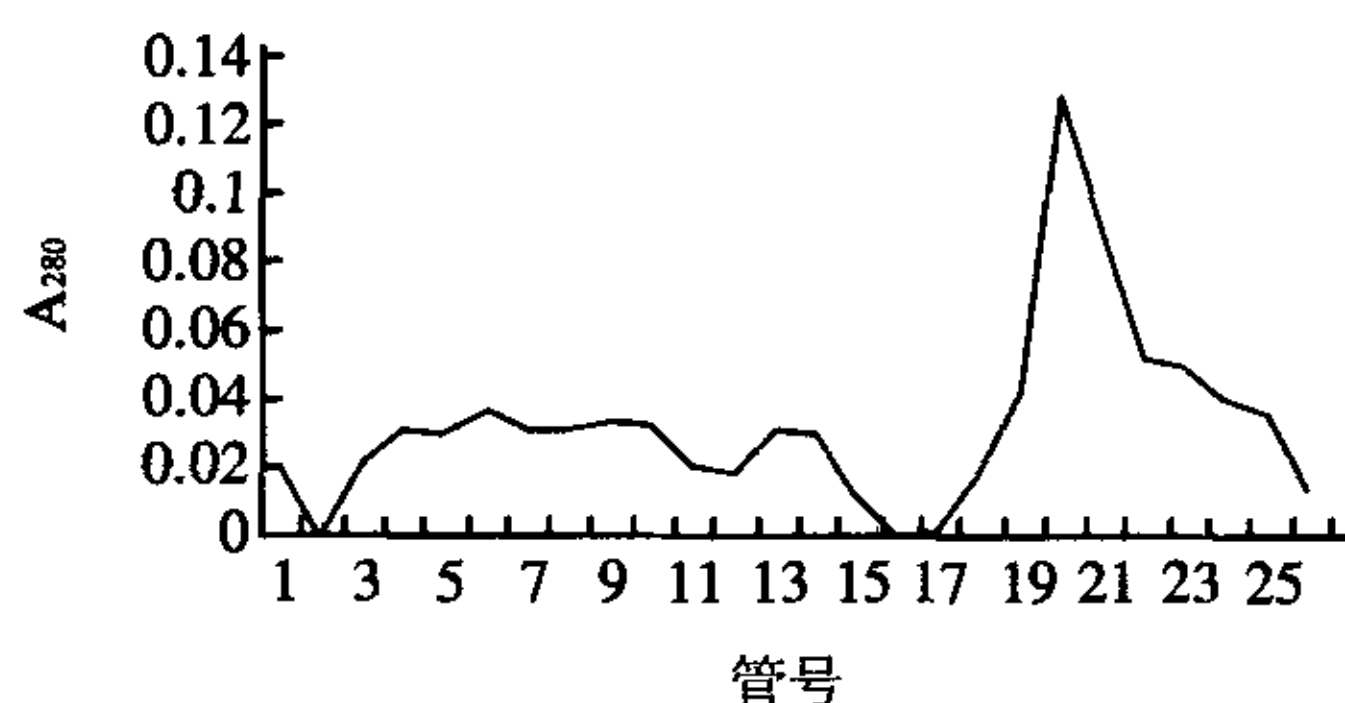


图2 藻胆蛋白 HA 柱层析色谱图
Fig.2 HA column chromatogram of Phycobiliprotein

未经过羟基磷灰石柱层析纯化的紫菜初提液的吸收光谱见图3, 有很多个吸收峰, 其中峰4为藻红蛋白在558nm处的吸收峰, 峰3位藻蓝蛋白在616nm处的吸收

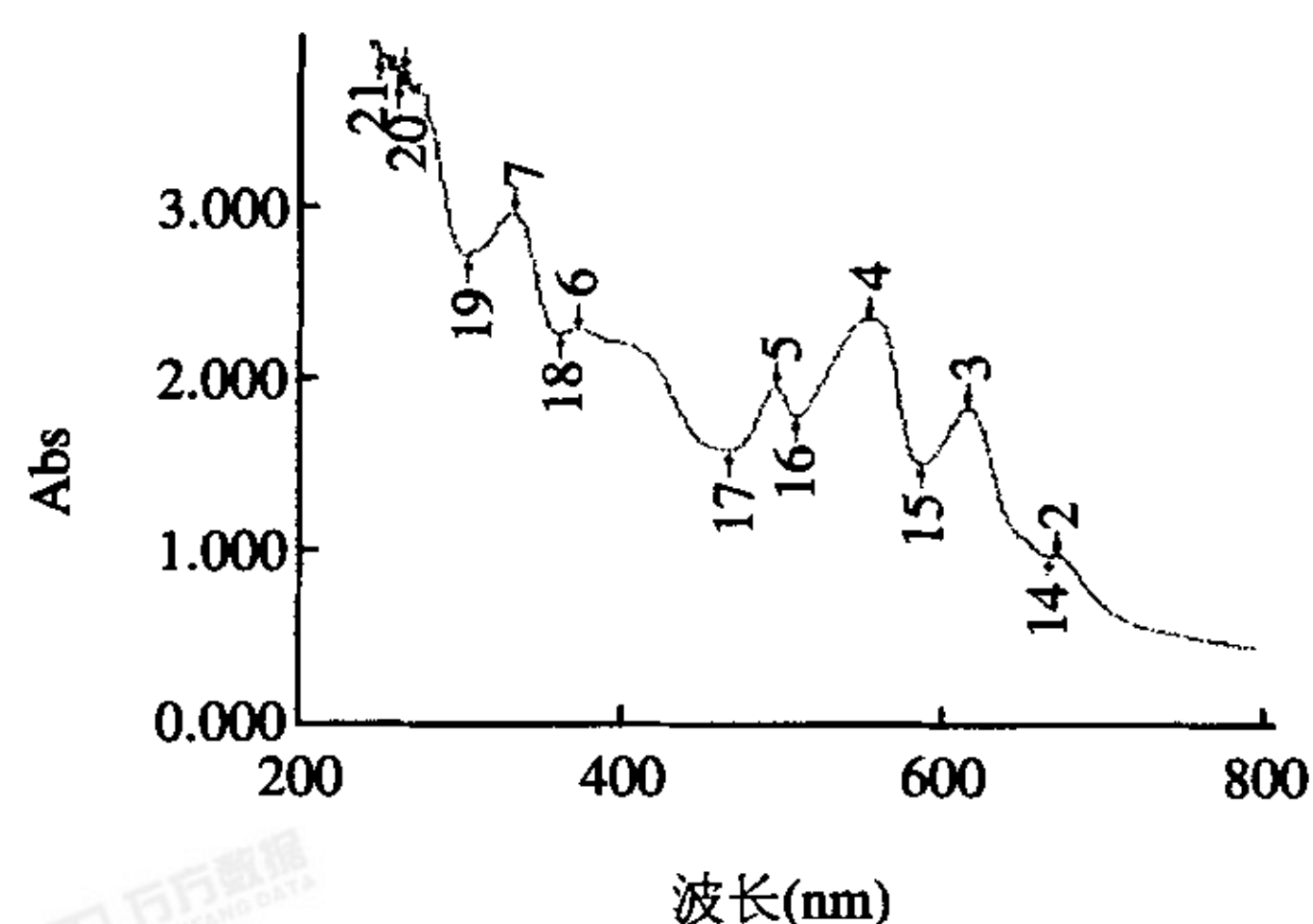


图3 紫菜提取液吸收光谱图
Fig.3 Absorption spectrum of laver extracts

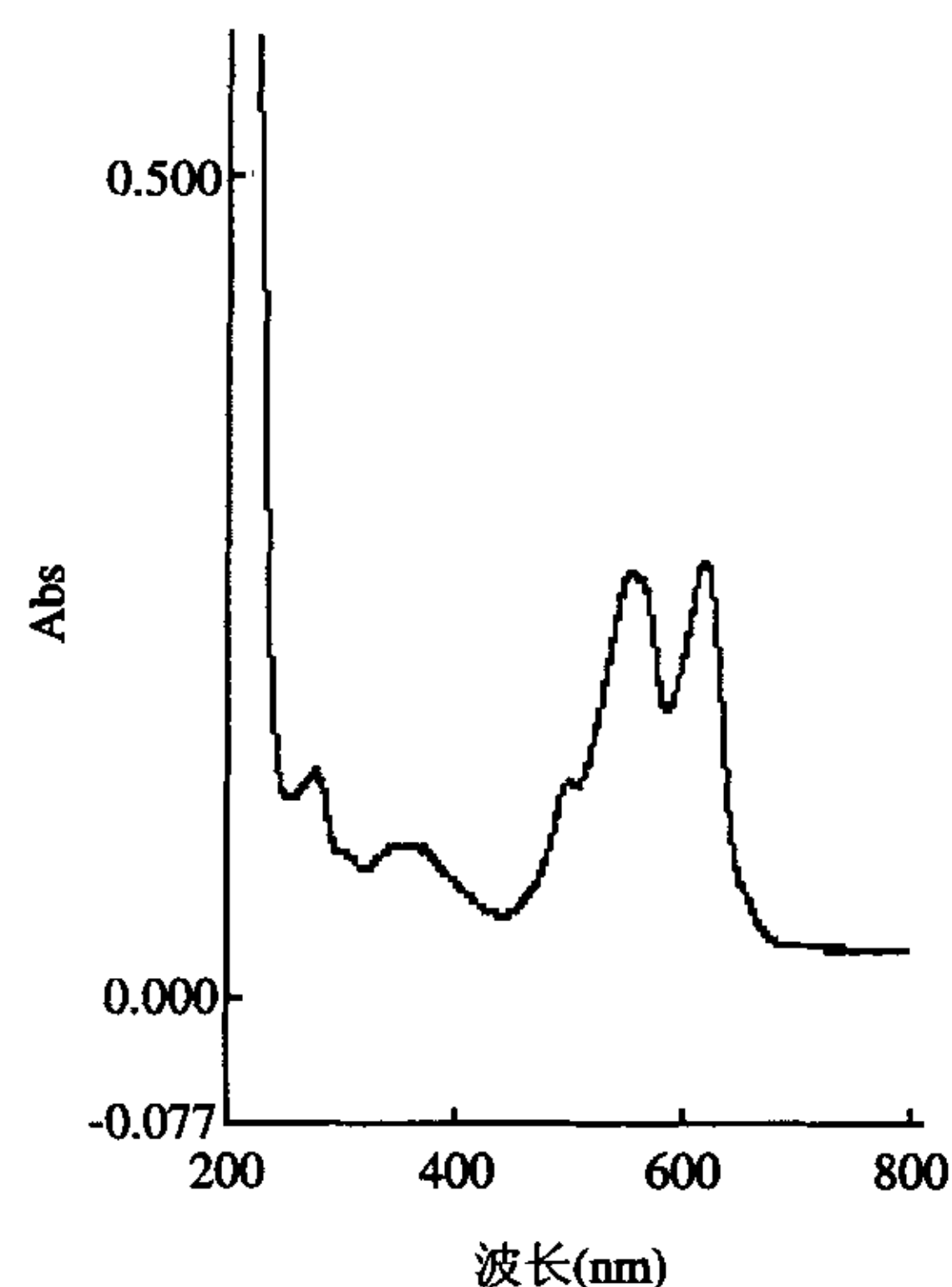


图4 藻胆蛋白组分吸收光谱
Fig.4 Absorption spectrum of the Phycobiliprotein

峰, 都较为明显, 其他的是还没有经过纯化去除的杂蛋白的吸收峰。

在经过 HA 柱层析纯化后, 分离得到较纯的藻胆蛋白, 其吸收光谱如图4所示。光谱扫描测得558nm为藻红蛋白的特征吸收峰, 616nm为藻蓝蛋白的特征吸收峰, 与伍华菊等^[16]报道的条斑紫菜的藻红蛋白的特征吸收峰564nm和藻蓝蛋白的特征吸收峰620nm接近。图4为藻胆蛋白组分的吸收光谱, 分别在558nm和616nm处有很明显吸收, 为藻红蛋白和藻蓝蛋白, 其纯度达到 $A_{\max}/A_{280nm}=(A_{558nm}+A_{616nm})/A_{280nm}=4.32$ 。得到的藻胆蛋白的纯度都大于4, 能达到纯度要求^[2]。

参考文献:

- [1] 王仲孚, 赵谋明, 彭志英, 等. 藻胆蛋白研究[J]. 生命的化学, 2000, 20(2): 72-75.
- [2] 彭为民, 商树田, 刘国琴, 等. 螺旋藻藻胆蛋白研究进展(综述)[J]. 农业生物技术学报, 1998, 6(2): 173-177.
- [3] 张建平, 谢洁, 张素萍, 等. 两种藻蓝蛋白的光动力光敏性质研究[J]. 科学通报, 1999, 44(5): 495-499.
- [4] Plank T. Subunit interactions and protein stability in the cyanobacterial light-harvesting proteins [J]. J Bacteriol, 1995, 177(23): 6789.
- [5] 周站平, 陈秀兰, 陈超, 等. 藻胆蛋白脱辅基蛋白对其抗氧化活性的影响[J]. 海洋科学, 2003, 27(5): 77-81.
- [6] 李定梅. 螺旋藻 - 全球人类最理想的食物[M]. 中国农业科技出版社, 1995: 3-8.
- [7] 吴萍. 藻胆蛋白与荧光免疫分析[J]. 生理科学进展, 2000, 31(1): 81-84.
- [8] Kronick M N, Grossman P D. Immunoassay techniques with fluorescent phycobiliprotein conjugates[J]. Clin Chem, 1983, 29(9): 1582-1586.

微波技术提取茶多糖的研究

聂少平, 谢明勇*, 罗 珍

(南昌大学 食品科学教育部重点实验室, 江西 南昌 330047)

摘 要: 为了保持茶多糖的生物活性, 提高得率, 采用微波技术提取茶多糖。通过正交试验确定了微波提取的最佳工艺参数, 用该法提取的茶多糖含量由蒽酮-硫酸法测定。试验结果表明, 微波提取茶多糖的最佳工艺参数为: 茶叶与水的质量比为 1:15, 在微波强度为 100% 的条件下提取 75s。通过与其它提取方法比较, 微波提取方法时间短, 得率高, 是茶多糖提取的一种优选方法。同时, 通过对 α -淀粉酶酶活抑制效果试验可以看出, 微波对茶多糖抑制 α -淀粉酶酶活的活性无影响。

关键词: 微波技术; 茶多糖; 提取

Extraction of Tea Polysaccharides by Microwave Technique

NIE Shao-ping, XIE Ming-yong*, LUO Zhen

(Key Laboratory of Food Science of Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: Tea polysaccharides were extracted by microwave technique in order to preserve their bioactivity and to improve their extracting rate. The optimum parameters of the technology were obtained through orthogonal test. Then this technique was used for the extraction of the tea polysaccharides whose contents were determined with anthrone-sulfuric acid method. The results showed that the optimum technical parameters were: the ratio of [S]/[L] of 1:15 and the extracting time of 75s under the microwave intensity of 100%. In contrast to other extraction methods, it was confirmed that the extraction rate of the microwave technique was higher and the extraction time was shorter. The microwave technique could be a better method for extracting the tea polysaccharides. Meanwhile, it was found that the ability inhibiting the α -amylase activity of the tea polysaccharides extracted by microwave technique has not been changed.

Key words: microwave technique; tea polysaccharides; extraction

收稿日期: 2004-11-18

* 通讯作者

基金项目: 国家自然科学基金项目(20462005); 江西省主要学科学术和技术带头人培养计划项目

作者简介: 聂少平(1978-), 男, 博士研究生, 主要从事食品化学与营养学研究。

-
- [9] Rebollosa Fuentes M M, Acien Ferná ndez G G, Sánchez Pérez J A, et al. Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*[J]. *Food Chem*, 2000, 70(3): 345-353.
 - [10] Herrera A. Recovery of c-phycocyanin from the cyanobacteria *Spirulina maxima*[J]. *J Appl Phycol*, 1989, (1): 325-331.
 - [11] 吴克刚, 杨连生, 黄通旺. 超声波破碎 *Thraustochytrium* 提取脂质的研究[J]. *郑州工程学院学报*, 2001, 22(4).
 - [12] 裴海燕, 李富生, 汤浅晶, 等. 藻细胞破碎释放有机物的特性[J]. *中国环境科学*, 2003, 23(3): 272-275.
 - [13] 温少红, 赵呈龙, 张莉萍. 紫球藻 B-藻红蛋白的分离纯化[J]. *中国海洋药物杂志*, 2001, (3): 33-35.
 - [14] 赵永芳. 生物化学技术原理及应用[M]. 科学出版社, 2002: 42-46.
 - [15] 吕延成, 曾庆华, 卢兴武. 羟基磷灰石层析法分离染色质中组蛋白的改进方法[J]. *东北师大学报自然科学版*, 1997, (2): 58-60.
 - [16] 伍华菊, 张建平, 夏安东. 条斑紫菜中 R-藻红蛋白的生化特性[J]. *生物化学与生物物理学报*, 1994, 26(5): 491-496.
 - [17] 王长海, 温少红, 欧阳藩. 紫球藻生物活性物质[J]. *海洋通报*, 1999, 18(3): 25-28.
 - [18] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术[M]. 科学出版社, 2002.
 - [19] 陈钧辉, 陶力, 李俊, 等. 生物化学实验[M]. 科学出版社, 2003.