

韩士群, 李辉东, 严少华, 等. 太湖蓝藻藻蓝蛋白的提取及纯化[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(4): 777-782.

太湖蓝藻藻蓝蛋白的提取及纯化

韩士群¹, 李辉东^{1,2}, 严少华¹, 夏明珠²

(1. 江苏省农业科学院农业资源与环境研究所, 江苏 南京 210014; 2. 南京理工大学工业化学研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 为利用太湖打捞蓝藻的蛋白质资源, 采用冻融破壁、絮凝、盐析、透析、双水相萃取等方法制备荧光试剂级藻蓝蛋白。研究表明, 以水为介质冻融 2 次破壁, 将冻融藻浆中蓝藻干物质调节为 0.95%, 用浓度为 7.5 g/L 的聚合氯化铝絮凝初分离, 所得藻蓝蛋白纯度(A_{620}/A_{280})为 0.31; 采用 20%、50% 饱和度的硫酸铵两步盐析可将其纯度(A_{620}/A_{280})提高至 2.29; 盐析后藻蓝蛋白经 100 000 的透析袋透析, 再以 140 g/L 的聚乙二醇(分子量 2 000)和 140 g/L 的磷酸钾盐萃取纯化, 最终纯度(A_{620}/A_{280})高达 4.60, 达到荧光试剂级要求。

关键词: 蓝藻; 藻蓝蛋白; 提取; 纯化

中图分类号: R284.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2012)04-0777-06

Extraction and purification of phycocyanin from blue algae in Lake Taihu

HAN Shi-qun¹, LI Hui-dong^{1,2}, YAN Shao-hua¹, XIA Ming-zhu²

(1. Institute of Agricultural Resource and Environmental Sciences, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Institute of Industrial Chemistry, Nanjing University of Science & Technology, Nanjing 210014, China)

Abstract: To utilize the protein resources in blue algae in Lake Taihu, an approach, which included repeated freeze-thaw cycles, flocculation, ammonium sulfate salting-out, and aqueous two-phase extraction was developed to obtain high purity phycocyanin. By freezing and thawing blue algae two times in water, the concentration of algae dry matter was adjusted to 0.95%. After flocculation by 7.5 g/L polymeric aluminum chloride, the phycocyanin with the purity (A_{620}/A_{280}) of 0.31 was isolated. The purity was improved to 2.29 through two-step salting-out with ammonium sulfate. Following the salting-out, the phycocyanin was dialyzed in a dialysis bag with molecular weight cut off of 100 000, and was then extracted with 140 g/L polyethylene glycol 2000 and 140 g/L potassium phosphate salt. Those steps led to a higher purity of phycocyanin, (A_{620}/A_{280}) being 4.60, which met the standard of fluorescent reagent grade.

Key words: blue algae; phycocyanin; extraction; purification

目前,机械和人工打捞已成为治理蓝藻暴发的重要应急措施,但打捞上岸的蓝藻处置不当会造成二次污染。目前,蓝藻处置和利用方式以产沼气和肥料为主^[1],但产品附加值低,经济效益不高。蓝

藻中藻蓝蛋白含量达 5% 以上^[2]。荧光试剂级藻蓝蛋白被国外垄断,其售价极高。因此,从蓝藻中获得高纯度藻蓝蛋白既能消除蓝藻对环境的污染又能产生可观的经济效益。

藻蓝蛋白传统的提取方法包括冻融破壁、离心分离、硫酸铵梯度盐析和羟基磷灰石等柱分离^[3],步骤多、操作复杂且成本较高。国外有人采用利凡诺沉淀法得到了纯度为 3.90 的藻蓝蛋白,总得率高达 46%^[4],但纯度较低,仍需用柱分离进一步纯化。也有人采用膨化床吸附法规模化提取藻蓝蛋白,此

收稿日期: 2012-03-16

基金项目: 江苏省太湖水环境治理科研项目(TH2010205)

作者简介: 韩士群(1966-),男,江苏宿迁人,博士,研究员,主要从事蓝藻治理和水体生态修复研究工作。(Tel) 025-84390241; (E-mail) shqunh@yahoo.com.cn

通讯作者: 严少华, (E-mail) shyan@jaas.ac.cn

法一步纯化可将纯度提高至 2.87^[5]。然而后续处理仍无法避免柱分离,限制了其规模化应用。针对上述方法的不足,本研究开展蓝藻藻蓝蛋白的提取和纯化研究,旨在为蓝藻高价值资源化利用提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用蓝藻为 2010 年 7 月取自太湖梅梁湾的表层水华(干物质为 5.70%),主要藻种为铜绿微囊藻,20 目筛网过滤除去杂物,-20 ℃ 冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 冻融破壁 准确称取一定量的藻泥,加入等量冻融介质,在-18 ℃ 与 35 ℃ 之间交替冻融数次。冻融结束后 14 000 r/min (Eppendorf-5804R 上海富众生物科技有限公司产品)、4 ℃ 离心 10 min,取上清液稀释至适合倍数,测定 280 nm、620 nm、650 nm 处的吸光度,计算藻蓝蛋白纯度和得率。根据冻融介质的不同,试验共设 6 个处理,分别为:H₂O、0.01 mol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)、30 g/L 的 NaCl、2.22 g/L 的 CaCl₂、30 g/L NaNO₃、6、30 g/L KNO₃,每处理 3 次重复。

1.2.2 絮凝 (1)藻浆中蓝藻干物质的确定:藻泥经冻融处理后,用蒸馏水稀释,设置藻浆中蓝藻干物质分别为 0.29%、0.32%、0.36%、0.41%、0.48%、0.57%、0.71%、0.95%、1.43%。加入 1.0% 聚合氯化铝(PAC),搅拌混匀,取上清液测定藻蓝蛋白纯度和得率。(2)聚合氯化铝浓度的确定:藻泥经冻融破壁后,用蒸馏水调节藻浆中蓝藻干物质为 0.95%,加入聚合氯化铝,设置聚合氯化铝浓度分别为 2.5 g/L、5.0 g/L、7.5 g/L、10 g/L、12.5 g/L,取上清液测定藻蓝蛋白纯度和得率。

1.2.3 盐析 (1)不同饱和度硫酸铵的盐析效果:将硫酸铵粉末加入到方法 1.2.2 的絮凝提取液中,使硫酸铵饱和度分别为 10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%,4 ℃ 静置过夜,5 000 r/min (RJ-TDL-50A 无锡瑞江分析仪器有限公司产品)离心 2 min。收集沉淀并用低浓度磷酸盐缓冲溶液溶解后和上清液一起测吸光度,计算其纯度和得率。(2)两步盐析:分别将絮凝提取液中硫酸铵饱和度调节至 10%、20%、25%、30%,4 ℃ 过夜并离心,取上清液,各组分别追加硫酸铵至 40%、45%、

50%、55%、60%、65% 和 70% 饱和度,4 ℃ 过夜并离心。盐析沉淀用低浓度磷酸盐缓冲液溶解后测定藻蓝蛋白纯度和得率。

1.2.4 双水相萃取 室温下,称取一定质量的聚乙二醇和盐放入 10 ml 尖底带盖离心管中,加入方法 1.2.3 获得的藻蓝蛋白 2 ml,分别加入不同质量的聚乙二醇、硫酸铵、酒石酸钾钠和磷酸钾盐萃取剂,用蒸馏水调节总质量为 10 g。混匀后静置分层,测量上下相体积,吸取顶相中萃取所得藻蓝蛋白溶液,测定其纯度及回收率。

(1)聚乙二醇分子量和成相盐种类的确定:聚乙二醇分子量分别为 1 000、2 000、4 000 和 6 000,成相盐分别为硫酸铵、酒石酸钾钠和磷酸钾盐。

(2)聚乙二醇浓度的确定:采用分子量为 2 000 的聚乙二醇,将其浓度设置为 100 g/L、120 g/L、140 g/L、160 g/L、180 g/L、200 g/L、220 g/L、240 g/L 和 260 g/L,再分别加入磷酸氢二钾、磷酸二氢钾(KH₂PO₄:K₂HPO₄=1.00:1.82,质量比)使其浓度为 250 g/L。

(3)磷酸钾盐浓度的确定:加入聚乙二醇(分子量为 2 000)使其浓度为 140 g/L,加入磷酸氢二钾、磷酸二氢钾(KH₂PO₄:K₂HPO₄=1.00:1.82,质量比)使其浓度分别为 120 g/L、140 g/L、160 g/L、180 g/L、200 g/L、220 g/L、240 g/L、260 g/L 和 280 g/L。

1.2.5 透析 将盐析所得藻蓝蛋白溶液分别置于截留分子量为 10 000 和 100 000 的透析袋中,4 ℃ 透析 24 h,中间更换 4~5 次透析液(pH 6.8, 0.001 mol/L PBS, 0.002 mol/L NaCl, 0.001 mol/L EDTA),透析完毕后,离心除去变性蛋白,稀释至适合倍数测其吸光度。

1.2.6 计算方法 藻蓝蛋白的纯度参照 Herrera 等的方法^[6]。藻蓝蛋白浓度以 Soni 等推荐的公式^[7]计算。

$$\text{藻蓝蛋白纯度: } P = A_{620} / A_{280}$$

$$\text{藻蓝蛋白浓度(g/L): } [PC] = (A_{620} - 0.7 \times A_{280}) / 7.38$$

$$\text{藻蓝蛋白得率: } PC = ([PC] \times V \times k_1) / (m \times k_2 \times 1\,000) \times 100\%$$

$$\text{藻蓝蛋白回收率: } Y = ([PC]_1 \times V_1) / ([PC]_0 \times V_0) \times 100\%$$

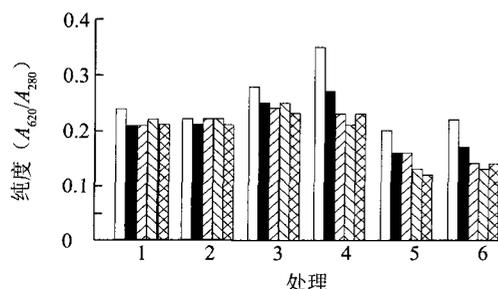
式中:A₂₈₀、A₆₂₀、A₆₅₀ 分别为波长 280 nm、620 nm、650 nm 处的吸光度;V 代表藻蓝蛋白体积;m 代表藻泥

质量; k_1 代表藻蓝蛋白稀释倍数; k_2 代表藻泥中蓝藻干物质的量;下标 V_0, V_1 分别代表双水相萃取前和萃取后的溶液体积。

2 结果

2.1 冻融破壁

图1和图2显示,随冻融次数的增加,各处理藻蓝蛋白纯度和得率均有不同程度的下降。这说明冻融2次已足以将藻细胞破壁,增加冻融次数对藻蓝蛋白提取不利。以水和0.01 mol/L磷酸盐缓冲溶液为冻融介质时,藻蓝蛋白纯度为0.21~0.24,相对其他处理较稳定。另外,以水为介质既节约成本又不会引入更多的化学试剂,对后续处理有利。因此,选择以水为介质冻融2次作为破壁条件。

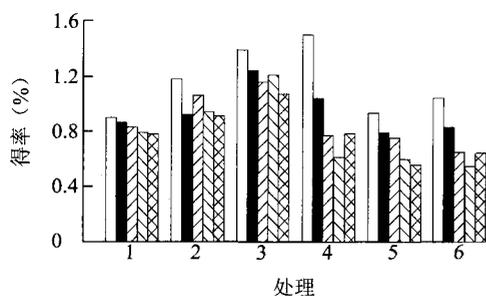


□冻融2次; ■冻融4次; □冻融6次; □冻融8次; □冻融10次

1~6为不同冻融介质处理,1为H₂O,2为0.01 mol/L磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0),3为30 g/L NaCl,4为2.22 g/L CaCl₂,5为30 g/L NaNO₃,6为30 g/L KNO₃。

图1 藻蓝蛋白纯度的变化

Fig.1 Changes of the purity of phycocyanin



□冻融2次; ■冻融4次; □冻融6次; □冻融8次; □冻融10次

1~6 见图1注。

图2 藻蓝蛋白得率的变化

Fig.2 Changes of the yield of phycocyanin

2.2 絮凝

2.2.1 藻浓度的确定 蓝藻干物质为0.29%~

1.43%时,藻蓝蛋白纯度和得率的变化趋势如图3所示。随蓝藻干物质含量的增加,藻蓝蛋白纯度从0.13增加至0.26,当蓝藻干物质大于0.95%时藻蓝蛋白纯度趋于稳定;藻蓝蛋白得率则先有小幅增加继而迅速下降,在蓝藻干物质为0.41%时达到最大值(1.99%)。这表明,降低藻浓度可以加速藻蓝蛋白等胞内物质的溶出,藻浓度过低会引入大量的其他蛋白质使藻蓝蛋白纯度降低。鉴于此,絮凝步骤应调节藻浆中蓝藻干物质含量为0.95%。

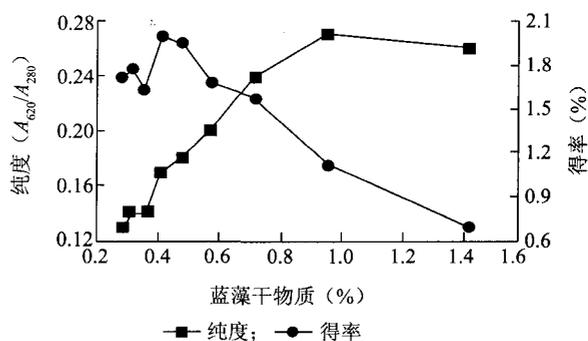


图3 蓝藻干物质浓度对藻蓝蛋白纯度和得率的影响

Fig.3 Effects of concentrations of blue algae dry matter on the purity and yield of phycocyanin

2.2.2 聚合氯化铝浓度的确定 藻蓝蛋白纯度随聚合氯化铝(PAC)浓度的增大而大幅增加,PAC浓度为7.5 g/L时纯度达到最大值(0.31),进一步增加PAC浓度则纯度略有下降。藻蓝蛋白得率则随PAC浓度的增大先增加后趋于稳定(图4)。聚合氯化铝不但可以除去藻细胞,而且会絮凝一部分蛋白质,其中含少量的藻蓝蛋白,但损失的少量藻蓝蛋白不足以影响其得率。因此采用浓度为7.5 g/L的聚合氯化铝絮凝。

2.3 盐析

2.3.1 不同饱和度硫酸铵的盐析效果 图5是10%~60%饱和度硫酸铵对藻蓝蛋白纯度和得率的影响。硫酸铵饱和度为30%~45%时,藻蓝蛋白纯度急剧增加,当硫酸铵饱和度大于50%后纯度开始下降。硫酸铵饱和度在30%与50%区间内,上清液中藻蓝蛋白得率降低,沉淀中得率升高,可见绝大部分藻蓝蛋白在此区间析出。

2.3.2 两步盐析对藻蓝蛋白纯度和得率的影响 从图6可以看出,不论第1次盐析硫酸铵饱和度如

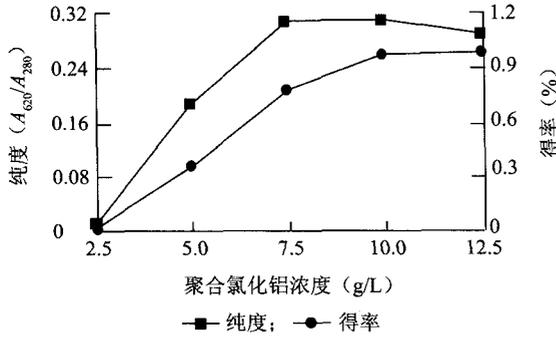


图4 聚合氯化铝浓度对藻蓝蛋白纯度和得率的影响

Fig. 4 Effects of concentrations of polymeric aluminum chloride on the purity and yield of phycocyanin

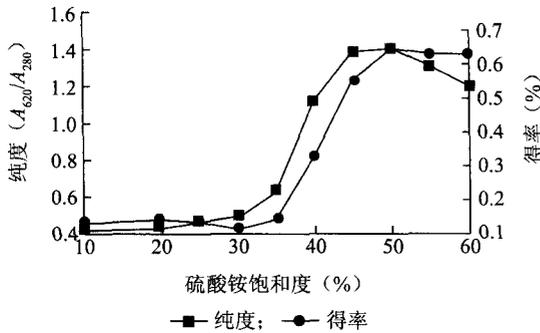


图5 一步盐析法硫酸铵饱和度对藻蓝蛋白纯度和得率的影响

Fig. 5 Effects of ammonium sulfate saturation on purity and yield of phycocyanin during one-step salting out

何,第2次盐析时随硫酸铵饱和度增加藻蓝蛋白纯度都是先增后减,在45%~50%处有一最大值。第一次盐析硫酸铵饱和度为20%时,两步盐析所得藻蓝蛋白纯度均较高。可见20%饱和度的硫酸铵去除杂质蛋白的能力较强。随第2次硫酸铵饱和度增加,藻蓝蛋白得率是先增加,在50%以后略有下降(图7)。因此,选择20%和50%饱和度的硫酸铵进行两步盐析。此时,藻蓝蛋白纯度和得率分别为2.29和0.64%。

2.4 双水相萃取

2.4.1 成相盐和聚合物分子量的确定 从表1可以看出,当聚乙二醇分子量为6000时,硫酸铵体系萃取所得藻蓝蛋白纯度为2.77~2.96,显著低于其他2种盐体系。当聚乙二醇分子量为1000时,酒石酸钾钠无法与聚乙二醇成相;磷酸钾盐体系萃取结果较稳定且所得藻蓝蛋白纯度较高。随聚乙二醇分子量的增加,藻蓝蛋白纯度先增后减,在聚乙二醇分

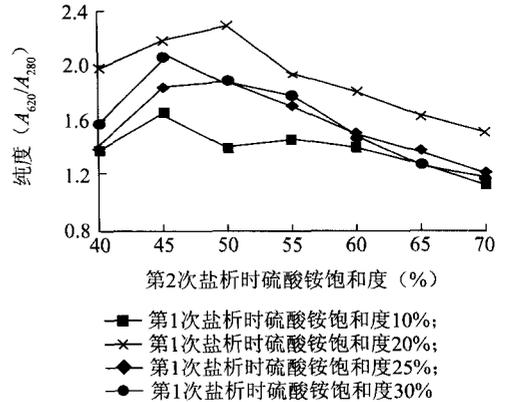


图6 两步盐析硫酸铵饱和度对藻蓝蛋白纯度的影响

Fig. 6 Effects of ammonium sulfate saturation on purity of phycocyanin during two-step salting out

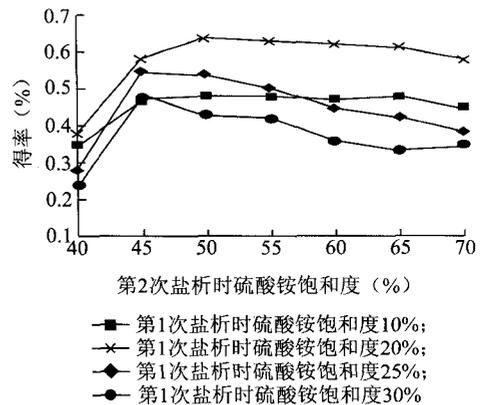


图7 两步盐析硫酸铵饱和度对藻蓝蛋白得率的影响

Fig. 7 Effects of ammonium sulfate saturation on yield of phycocyanin during two-step salting out

子量为2000或4000时达到最大值。在聚乙二醇/磷酸钾盐体系中,聚乙二醇分子量为2000时藻蓝蛋白纯度最高(4.00)。因此选择聚乙二醇2000/磷酸钾盐体系进一步研究。

2.4.2 成相物质浓度的确定 图8显示,随聚乙二醇浓度的增加,藻蓝蛋白纯度先增后减,在聚乙二醇浓度为140 g/L时达到最大值(3.86)。藻蓝蛋白回收率最高为93.97%,最低为87.06%,变化不明显。

图9显示,随磷酸钾盐浓度的增加,藻蓝蛋白纯度先增后减,在磷酸钾盐浓度为140 g/L时达到最大值(3.90),藻蓝蛋白回收率为87.80%~94.98%。

增加成相物质的浓度可以增大两相的差异,有利于藻蓝蛋白富集到聚乙二醇相。但是浓度过高会

增大萃取体系的黏度和相界面的张力,对传质不利。结果表明 140 g/L 的聚乙二醇 2 000和 140 g/L 的

磷酸钾盐为较好的萃取条件。萃取所得藻蓝蛋白纯度为 3.90,回收率高达 91%。

表 1 成相盐和聚合物分子量对藻蓝蛋白纯度的影响

Table 1 Effects of phase forming salt and polymer molecular weight on the purity of phycocyanin

成相盐	聚乙二醇质量浓度 (g/L)	盐质量浓度 (g/L)	聚乙二醇分子量			
			1 000	2 000	4 000	6 000
藻蓝蛋白纯度(A_{620}/A_{280})						
硫酸铵	100	250	3.11	3.51	3.53	2.96
	150	200	2.61	3.84	3.10	2.77
	200	150	2.33	3.33	3.34	2.86
酒石酸钾钠	100	250	-	3.55	3.35	3.54
	150	200	-	3.70	3.24	3.39
	200	150	-	3.59	3.26	3.39
磷酸钾盐	100	250	3.35	3.48	3.37	3.45
	150	200	2.80	4.00	3.27	3.25
	200	150	2.93	3.50	3.04	3.16

-表示该体系未分层;藻蓝蛋白初始纯度为 3.10。

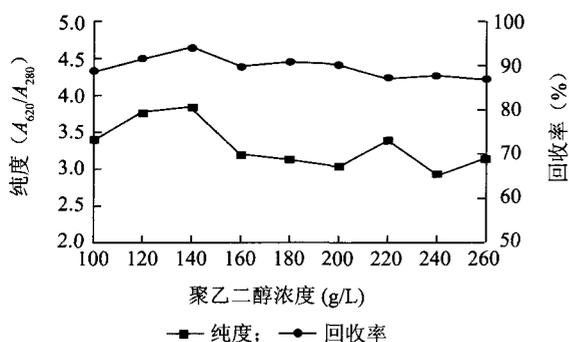


图 8 聚乙二醇浓度对藻蓝蛋白纯度和回收率的影响
Fig. 8 Effects of polyethylene glycol concentration on the purity and yield of phycocyanin

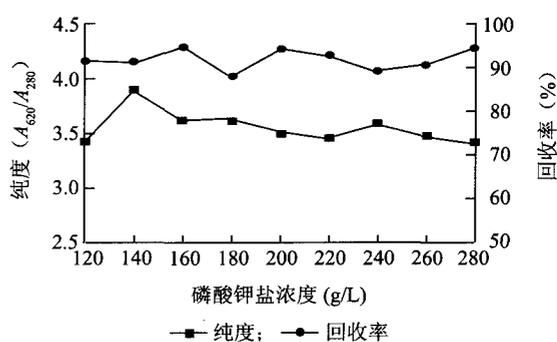


图 9 磷酸钾盐浓度对藻蓝蛋白纯度和回收率的影响
Fig. 9 Effects of potassium phosphat salt concentration on the purity and yield of phycocyanin

2.5 透析

盐析后的藻蓝蛋白经100 000的透析袋透析后纯度为 4.20,明显优于 10 000 透析后的纯度 (3.77)。这是因为藻蓝蛋白通常以三聚体和六聚体形式存在。其中三聚体的分子量为103 800,截留分子量为100 000的透析袋刚好能将藻蓝蛋白截留下来,将其他小分子透析除去;而截留分子量为 10 000的透析袋虽然能够除去加入的聚合氯化铝和硫酸铵等小分子,但是还可能介有 10 000 与 100 000之间的小分子影响藻蓝蛋白纯度。因此,截留分子量为100 000的透析袋透析效果较好。透析后纯度为 4.20 的藻蓝蛋白再用 140 g/L的聚乙二醇

2 000和 140 g/L的磷酸钾盐萃取可得纯度为 4.60 的藻蓝蛋白。

3 讨论

研究简单高效的藻蓝蛋白提取纯化技术是实现蓝藻高附加值资源化利用的关键。另外,高纯度藻蓝蛋白被国外垄断,价格居高不下,急需开发出一套低成本的生产方法。为此,本研究对传统的方法进行了改进,简化提取步骤,降低生产成本。(1)藻蓝蛋白的提取原料通常为螺旋藻,价格高。本试验所用材料水华蓝藻,无需特殊培养,原料易得,既降低了藻蓝蛋白的生产成本又解决了蓝藻的处置问题。

(2)分离藻蓝蛋白提取液的传统方法是高速离心。其缺点是能耗高,不宜大批量生产。最近出现了超滤、利凡诺沉淀、膨化床吸附等新的分离手段^[4-5,8],虽然易于放大规模但操作繁琐。本试验采用絮凝技术能够快速获得大量的藻蓝蛋白提取液,操作简单,所用絮凝剂聚合氯化铝价格便宜且安全无毒。(4)有人采用六步盐析法获得了纯度为3.61的藻蓝蛋白^[9]。此法纯度虽高,但试剂消耗量较大,且需要反复离心,操作繁琐。本试验采用20%和50%饱和度的硫酸铵两步盐析法所得藻蓝蛋白纯度为2.29,大大减少了硫酸铵的消耗。(5)盐析后的藻蓝蛋白经100 000透析袋透析,然后用双水相萃取法对其纯化,最高纯度达4.60,不需要使用柱分离,既节约了试剂又缩短了纯化时间。

综上所述,提取藻蓝蛋白的工艺条件如下:以水为介质,冻融2次破壁;调节藻浓度为0.95%,用7.5 g/L的聚合氯化铝絮凝分离获得藻蓝蛋白粗提液;再分别用20%和50%饱和度的硫酸铵两步盐析得到纯度为2.29的藻蓝蛋白;然后将藻蓝蛋白置于100 000透析袋中透析;最后向透析后的藻蓝蛋白溶液中加入140 g/L的聚乙二醇2 000和140 g/L的磷酸钾盐萃取,最终获得了纯度为4.60的藻蓝蛋白。

参考文献:

[1] 韩士群,严少华,王震宇,等.太湖蓝藻无害化处理资源化利用

[J].自然资源学报,2009,24(3):431-437.

- [2] 范良民.滇池蓝藻成分分析及利用途径探讨[J].云南环境科学,1999,18(2):46-47.
- [3] 哈成勇,沈敏敏,刘志猛.天然产物化学与应用[M].北京:化学工业出版社,2003:464-465.
- [4] MINKOVA K M, TCHERNOV A A, TCHORBADJIEVA M I, et al. Purification of phycocyanin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*[J]. Journal of Biotechnology, 2003, 102: 55-59.
- [5] NIU J F, WANG G C, LIN X Z, et al. Large-scale recovery of phycocyanin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography [J]. Journal of Chromatography B, 2007, 850: 267-276.
- [6] HERRERA A, BOUSSIBA S, NAPOLEONE V, et al. Recovery of phycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina maxima* [J]. Journal of Applied Phycology, 1989, 1: 325-331.
- [7] SONI B, KALAVADIA B, TRIVEDI U, et al. Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata*-isolate from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India [J]. Process Biochemistry, 2006, 41: 2017-2023.
- [8] 沈强,沈银武,刘永定,等.滇池水华蓝藻藻蓝蛋白的分离纯化与毒性研究[J].环境化学,2009,28(4):497-501.
- [9] 王巍杰,徐长波,程红燕.盐析法分离藻蓝蛋白的研究[J].食品科技,2010,35(5):238-241.

(责任编辑:汪恒英)