

# 双水相萃取法富集分离螺旋藻藻蓝蛋白的研究

刘 杨,王雪青,庞广昌,谢卓峰

(天津市食品生物技术重点实验室,天津商业大学 生物技术与食品科学学院,天津 300134)

**摘要:**以 PEG/硫酸钠双水相体系,经一次萃取从钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)细胞破碎液中富集分离藻蓝蛋白。结果表明,萃取最适宜的条件为 12% PEG4000,15% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,1% KCl,藻蓝蛋白收率为 91.2%,分配系数达到 8.01,分离因数达到 6.33。对于螺旋藻藻蓝蛋白的富集分离,双水相萃取法与传统的盐析沉淀法相比,具有节省操作时间、简化操作过程、降低能耗和成本以及易于工艺放大等优点。

**关键词:**螺旋藻(*Spirulina*);藻蓝蛋白;聚乙二醇;双水相体系;萃取

中图分类号:TS201.21

文献标识码:A

文章编号:1000-3096(2008)07-0030-03

螺旋藻(*Spirulina*)是丝状的多细胞蓝藻,其藻体细胞内的氨基酸种类齐全且蛋白质含量高,因含有多种对人体有益的营养物质而受到广泛的关注。藻蓝蛋白是螺旋藻中的主要蛋白成分,临床研究结果表明,藻蓝蛋白具有提高人体免疫力,促进动物血细胞再生,抑制某些癌细胞等作用<sup>[1]</sup>,同时在抗辐射、抗疲劳、清除自由基等方面也具有一定的生理活性<sup>[2]</sup>,因此螺旋藻藻蓝蛋白的研究成了螺旋藻类蛋白研究的热点<sup>[3]</sup>。已报道的螺旋藻藻蓝蛋白的分离纯化方法多采用传统的盐析沉淀法<sup>[4]</sup>,该方法包括沉淀、离心和透析这三个主要操作环节,在实际工业化生产过程中存在操作步骤烦琐,动力能耗高以及操作周期长等缺点。

双水相系统是指某些亲水性高分子聚合物的水溶液超过一定浓度后可形成两相,并且在两相中水分均占很大比例,Albertsson<sup>[5]</sup>于 20 世纪 50 年代后期开发了双水相萃取法。70 年代以后,众多科学家发展了双水相萃取技术在生物分离过程中的应用<sup>[6]</sup>,为蛋白质特别是胞内蛋白质的分离与纯化开辟了新的途径。

本研究的目的是探讨一种简单有效的适合大量富集分离螺旋藻藻蓝蛋白的方法——双水相萃取法,并对该方法萃取藻蓝蛋白的萃取条件进行优化。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)粉产自内蒙古鄂托克旗乌兰镇,PEG600~6000 为国产分析纯试剂,Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>等无机盐均为国产分析纯试剂。

### 1.2 分析方法

螺旋藻中以藻胆蛋白吸收光谱的差异作为其检

定的标准。藻蓝蛋白(PC)在 620 nm 处有最大光吸收值,其含量测定方法参考王广策等<sup>[7]</sup>的相关研究内容,如式(1)所示。藻蓝蛋白的纯度为溶液在 620 和 280 nm 的吸光度的比值。

$$C_{PC} = 0.1425A_{620} \quad (1)$$

而别藻蓝蛋白(APC)最大光吸收在 650 nm,其质量浓度的测定根据 Kaplan 等<sup>[8]</sup>采用的方法。

$$C_{APC} = \frac{A_{650} - 0.208A_{620}}{5.09} \quad (2)$$

其中, $C_{PC}$ , $C_{APC}$ 分别代表藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白的质量浓度(g/L), $A_{620}$ , $A_{650}$ 分别代表波长在 620,650 nm 处的吸光度。

## 1.3 双水相萃取

### 1.3.1 螺旋藻细胞破碎

准确称取 0.5 g 螺旋藻粉,加入 100 mL pH 为 7.0 的 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液,采用反复冻融(3 次)的方法对藻体细胞进行破碎,在显微镜下观察计数细胞破碎率可达到 90%以上。将破碎的螺旋藻细胞悬浊液于 4 000 r/min 离心 20 min,倾倒入清液可得到含藻蓝蛋白的粗提液。测粗提液在 620,650 nm 下的吸光度,计算藻蓝蛋白的含量。

### 1.3.2 双水相萃取

在粗提液中加入一定量的 PEG 和无机盐,充分振荡使成相物质溶解,同时完成了藻蓝蛋白在双水相系统中的分配过程。此双水相系统静置一定时间,当两相达到相分离,分别用移液管抽取上下相的

收稿日期:2007-08-01;修回日期:2008-04-10

基金项目:天津市重大科技攻关项目(06 YFGZNC04200)

作者简介:刘杨(1978-),女,河北秦皇岛人,讲师,博士,主要从事海洋活性物质提取研究,E-mail:liuyanglft@yahoo.com.cn

溶液,在波长 280,620,650 nm 下测吸光度,计算藻蓝蛋白的质量浓度和纯度。

### 1.3.3 藻蓝蛋白收率、分配系数和分离因数

经双水相系统萃取过的螺旋藻细胞破碎液(粗提液)中,藻蓝蛋白富集于双水相系统的上相中,因此计算藻蓝蛋白收率( $E$ )、分配系数( $K$ )和分离因数( $\beta$ )如下式:

$$E = \frac{C_{PC,t} \times V_t}{C_{PC,o} \times V_o} \times 100 \% \quad (3)$$

$$K = \frac{C_{PC,t}}{C_{PC,b}} \quad (4)$$

$$\beta = \frac{C_{PC,t} / C_{PC,b}}{C_{APC,t} / C_{APC,b}} \quad (5)$$

式(3)~(5)中的 $V$ 代表溶液体积,下标 $o,t,b$ 分别代表粗提液、萃取后双水相系统上相和下相的溶液。

## 2 结果与讨论

双水相萃取与其他分离方法相比,具有易放大、操作时间短、成相物质对待分离的生物活性物质无毒副作用等优点。在双水相体系中,待分离的组分选择性分配于其中一相,而其他杂质组分分配于另一相中,因此使待分离组分的浓度和纯度都得到提高。其中影响双水相萃取的因素很多,主要有:聚合物种类、聚合物平均分子质量和浓度、成相无机盐种类和浓度、离子强度、pH 值等等。本实验选取聚乙二醇(PEG)进行实验研究,考察 PEG 平均分子质量和浓度、成相无机盐浓度、离子强度和 pH 值对双水相萃取藻蓝蛋白的影响,以确定最佳的萃取条件。

### 2.1 PEG 平均分子质量对双水相体系平衡的影响

PEG 平均分子质量对双水相体系平衡的影响很大(表 1)。由表 1 可知,PEG 平均分子质量越低,水溶性越好,成相的临界浓度越高,即在相同的聚合物和无机盐浓度下,PEG 平均分子质量低的溶液不能形成双水相体系;待分离的组分自身的性质也会影响双水相体系成相的临界浓度。因此对于不同的分离提取对象,选择适宜的 PEG 平均分子质量是十分必要的。

表 1 PEG 平均分子质量对双水相体系的影响

Tab.1 Effect of average molecular weight of PEG on the aqueous two-phase system

项目	PEG 分子质量				
	600	1 000	2 000	4 000	6 000
质量分数 (%)	10	10	10	10	10
溶液分层情况	否	否	否	是	是

注:上述溶液中包含 0.5% 螺旋藻粉和 15%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$

### 2.2 PEG 浓度对双水相体系萃取藻蓝蛋白的影响

聚合物浓度是影响双水相萃取的重要因素之一。本实验选用平均分子质量为 4 000 的 PEG 进行研究,随着 PEG 4 000 浓度的增加,双水相体系离开成相临界点距离增大,上相体积也逐渐增加,因此对藻蓝蛋白的收率  $E$  也有很大的影响。实验结果如表 2 所示,当硫酸钠质量分数保持在 15%,PEG 质量分数从 6% 增加到 12% 时,藻蓝蛋白的收率  $E$  从 58.1% 相应增大到 93.5%,同时其分配系数  $K$  从 3.36 增加到 8.12,而分离因数  $\beta$  的变化并不明显。由此可见,PEG 浓度的变化对双水相体系对目标蛋白的选择性影响并不明显。

表 2 PEG 浓度对双水相萃取藻蓝蛋白的影响  
Tab. 2 Effect of PEG concentration on aqueous two-phase extraction of c-phycoyanin

PEG 质量分数 (%)	上相体积 (mL)	相比	$E$ (%)	$K$	$\beta$
6	1.5	0.23	58.1	3.36	2.38
8	1.8	0.29	72.3	5.21	2.25
10	2	0.33	88.1	6.38	2.65
12	2.2	0.38	93.5	8.12	2.78

注:双水相体系(8 mL)的组成是 PEG 4 000 和 15%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$

### 2.3 硫酸钠浓度对双水相体系萃取藻蓝蛋白的影响

硫酸钠浓度对双水相体系分配平衡的影响与 PEG 浓度的影响类似,同样随着硫酸钠浓度的增加,双水相体系离开成相临界点距离增大。由表 3 所示,双水相体系的相比随硫酸钠浓度的增加而下降,而藻蓝蛋白的收率及分配系数随硫酸钠浓度的增加达到最大值;另一方面,与 PEG 浓度的影响不同的是盐浓度对藻蓝蛋白的分离因数有显著的影响,随硫酸钠浓度的增加藻蓝蛋白的分离因数逐渐增大,这是由于待分离组分中各种蛋白质表面特性差异导致在萃取分离过程中受到无机盐离子的静电作用也产生差异,这非常有利于藻蓝蛋白与螺旋藻中其他藻胆蛋白(藻红蛋白和别藻蓝蛋白)的萃取分离。当硫酸钠质量分数在 15% 时,藻蓝蛋白的收率  $E$  到达 93.1%,分配系数  $K$  可达到 8.09,但其分离因数  $\beta$  却为 2.72,这对于该萃取分离过程的工业化应用并不理想,因此将进一步考察离子强度对该双水相萃

取的影响。

表3 硫酸钠浓度对双水相萃取藻蓝蛋白的影响

Tab.3 Effect of  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  concentration on aqueous two-phase extraction of c-phycoerythrin

$\text{Na}_2\text{SO}_4$ 质量 分数(%)	上相体积 (mL)	相比	$E$ (%)	$K$	
10	3.1	0.63	63.7	4.23	1.06
12	2.5	0.45	78.9	5.95	1.39
15	2.2	0.38	93.1	8.09	2.72
18	2	0.33	84.6	6.82	3.24
20	1.8	0.29	77.4	5.38	3.94
25	1.7	0.27	58.3	3.68	4.36

注:双水相体系(8 mL)的组成是  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 和 12% PEG

## 2.4 离子强度对双水相体系萃取藻蓝蛋白的影响

在双水相体系中,适当增加离子强度可加快分离速度,并可提高目标产物的选择性。一般可加入中性盐如  $\text{NaCl}$ 、 $\text{KCl}$  等,本实验选用  $\text{KCl}$  作为研究对象,考察离子强度对双水相萃取的影响。如表4所示,当  $\text{KCl}$  浓度增大时,藻蓝蛋白的收率和分配系数都逐渐降低,但在  $\text{KCl}$  质量分数为 1%时,藻蓝蛋白的分离因数 达到最大值 6.33,此时藻蓝蛋白的收率  $E$  为 91.2%,分配系数  $K$  为 8.01,此时可使藻蓝蛋白得到良好的富集分离效果。

表4 离子强度对双水相萃取藻蓝蛋白的影响

Tab.4 Effect of ion strength on aqueous two-phase extraction of c-phycoerythrin

$\text{KCl}$ 质量 分数(%)	上相体积 (mL)	相比	$E$ (%)	$K$	
0	2.2	0.38	93.6	8.15	2.80
1	2	0.33	91.2	8.01	6.33
3	2	0.33	80.2	6.47	3.74
5	2	0.33	71.6	5.39	3.33
7	2	0.33	64.2	4.02	2.96
9	2	0.33	58.3	3.89	2.85

注:双水相体系(8 mL)的组成是 12% PEG和 15%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$

## 2.5 双水相萃取法富集分离藻蓝蛋白的方法与其他分离方法的比较

分离螺旋藻中藻蓝蛋白的传统方法均采用盐析沉淀与层析分离相结合,层析柱多选用羟基磷灰石介

质<sup>[4,7]</sup>,此方法的操作步骤烦琐,耗时长,成本高,但分离得到的藻蓝蛋白纯度可达到 5.5<sup>[7]</sup>,优于本研究富集分离藻蓝蛋白的纯度 2.1,表明采用双水相萃取的方法富集分离藻蓝蛋白尚有其局限性,其进一步的工艺条件有待于深入摸索和提高。

## 3 结论

研究表明,12% PEG4000,15%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,1%  $\text{KCl}$  的双水相体系用于萃取螺旋藻细胞破碎液中藻蓝蛋白,经一次萃取藻蓝蛋白收率可达 91.2%,分配系数达到 8.01,分离因数达到 6.33。结果证实螺旋藻藻蓝蛋白在该体系中的分配系数和分离因数均较高,因此用双水相萃取法富集分离藻蓝蛋白在理论上是可行的。相比传统的包含了沉淀、离心和透析这三个操作环节的盐析沉淀法,双水相萃取法富集分离螺旋藻藻蓝蛋白具有节省操作时间、简化操作过程、降低操作成本和能耗以及易于工艺放大等优点。

### 参考文献:

- [1] 沈海雁,王习霞.螺旋藻藻蓝蛋白对人血癌细胞株 HL-60、K-552 和 L-937 生长影响[J]. 海洋科学, 2000, 24(1): 45-48.
- [2] 赵井泉,张建平.用脉冲辐解法研究藻胆蛋白与羟基自由基反应动力学[J]. 科学通报, 2000, 45(1): 32-36.
- [3] Grazer A N, Fang S. Formation of hybrid proteins from and subunits of phycoerythrin of unicellular and filamentous blue-green algae [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1973, 248(2): 663-671.
- [4] 郑江.藻蓝蛋白的提取纯化研究进展[J]. 食品科学, 2002, 23(11): 159-161.
- [5] Albertsson P-A. Partition of cell particles and macromolecules [M]. New York: John Wiley, 1986. 135-139.
- [6] Marca C La, Lenhoff A M, Dhurjati P. Partitioning of host and recombinant cells in aqueous two-phase polymer systems[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1990, 36: 484-492.
- [7] 王广策,周百成,曾呈奎.钝顶螺旋藻 C-藻蓝蛋白和多管藻 R-藻红蛋白的分离及其摩尔消光系数的测定[J]. 海洋科学, 1996, 20(1): 52-55.
- [8] Kaplan D, Calvert H E, Peters G A. The azolla-anabaena azollae relationship. . nitrogenase activity and phycobiliproteins of the endophyte as a function of leaf age and cell type[J]. *Plant Physiol*, 1986, 80: 884-890.

(下转第 37 页)

# Aqueous two-phase extraction for enrichment and isolation of $\alpha$ -phycoerythrin from spirulina

LIU Yang , WANG Xue-qing , PANG Guang-chang , Xie Zhuo-feng

(Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology(PEG) , College of Biotechnology and Food Science , Tianjin University of Commerce , Tianjin 300134 ,China)

**Received :** Aug. , 1 , 2007

**Key words :** *Spirulina*;  $\alpha$ -phycoerythrin; polyethylene glycol(PEG) ; aqueous two-phase system; extraction

**Abstract :** Aqueous two-phase system composed of PEG/  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  was once to enrich and isolate  $\alpha$ -phycoerythrin from the supernatant of disrupted *Spirulina* cell in this paper. The optimum extraction conditions were: 12 % PEG, 15 %  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  , 1 % KCl , the partition coefficient of  $\alpha$ -phycoerythrin was as high as 8.01 , with a yield of 91.2 % . The separation factor was increased to 6.33. The preliminary study indicated that aqueous two-phase extraction was better than traditional salt-out precipitation for enrichment and isolation of  $\alpha$ -phycoerythrin.

(本文编辑:张培新)