

坛紫菜中藻胆蛋白的性质 与化学组成研究*

高洪峰 曹文达 纪明侯

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

提要 坛紫菜(于 1988 年采自青岛太平角海区人工养殖筏上)的水溶性色素粗提物经过硫酸铵沉淀和羟基磷灰石(HA)柱层析后,分离出藻蓝蛋白(RPC)、藻红蛋白(RPE)和变藻蓝蛋白(APC)。在中性介质中,其吸收光谱和荧光发射光谱与文献报道基本一致;但在酸性(pH = 3)或碱性(pH = 12)介质中,吸收光谱较在中性介质中有明显改变,原有的荧光性质也消失。RPC 和 APC 只分离到一种聚集体,但 RPE 有两种不同的聚集体。用 Sephadex G-100 凝胶过滤方法测量藻胆蛋白的分子量分别为:RPC 117 000, APC 122 000, 小分子 RPE 38 000, 大分子 RPE 232 000。对三种藻胆蛋白的氨基酸分析的结果表明,三种藻胆蛋白中都是酸性氨基酸的含量大于碱性氨基酸的含量。

关键词 坛紫菜 藻胆蛋白 化学组成

藻胆蛋白是红藻、蓝藻和某些甲藻中的一类特有的光合作用天线色素,按其光谱特性可分为:藻红蛋白、藻蓝蛋白和变藻蓝蛋白。红藻门中含有的藻红蛋白和藻蓝蛋白又分别称为 R-藻红蛋白(RPE)和 R-藻蓝蛋白(RPC)。坛紫菜是一种经济价值很高的红藻,本文对由南方移植北方养殖的坛紫菜所含藻胆蛋白的性质和化学组成进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 样品的采集 坛紫菜(*P. haitanensis*)于 1988 年 11 月采自青岛太平角海区人工养殖筏,采后海水洗净。

1.2 粗品混合藻胆蛋白的提取 将新鲜的坛紫菜用蒸馏水浸泡,放冰箱中(约 4℃)自溶提取,时而搅拌;约一周后用纱布过滤,滤液离心(5 000r/min, 4℃, 15min)除去碎屑,在澄清的紫红色溶液中加入硫酸铵至饱和度约 55%,放置冰箱中(约 4℃)沉淀过夜;然后离心(5 000r/min, 4℃, 15min),弃去溶液,收集粗的藻胆蛋白。

粗的藻胆蛋白用尽量少的蒸馏水溶解,经蒸馏水透析至硫酸铵除净,离心除去藻胆蛋白变性物,溶液冻干,所得紫红色固体即为提取的混合藻胆蛋白。

1.3 藻胆蛋白的分离和纯化 混合的藻胆蛋白以羟基磷灰石(Hydroxylapatite)为吸附剂进行柱层析,羟基磷灰石按 Siegelman 等(1978)的方法制备。洗脱剂为 0.005—0.25 mol/L 的磷酸钾缓冲液(pH = 6.7, 0.2mol/L NaCl),从低浓度到高浓度进行梯度洗脱,RPC, RPE 和 APC 在柱上逐渐分离,依次被洗脱下来,分别收集 3 种藻胆蛋白溶液,

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 1865 号。国家自然科学基金资助,3870137 号。

收稿日期:1990 年 9 月 25 日;接受日期:1991 年 10 月 5 日。

此时得到的 RPC, RPE 和 APC 的纯度(指其在可见光区最大吸收处与 280nm 处的 O. D 值之比)分别为 5, 4.5 和 6。分别经蒸馏水透析, 冻干, 得 3 种固体藻胆蛋白。

将在羟基磷灰石层析柱上洗脱下来并经纯化的 RPC, RPE 和 APC, 再经 Sephadex G-100(1.2 × 90 cm) 凝胶柱层析, 洗脱液为 0.05 mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH = 7.0, 0.1 mol/L NaCl), RPC 和 APC 仍为一个色带, 但 RPE 得到两个红色带。

1.4 吸收光谱和荧光发射光谱测定 经纯化后的 3 种藻胆蛋白, 分别在中性 (pH = 7 左右的蒸馏水中)、酸性(用 0.5mol/L HCl 调至 pH = 3)、碱性(用 0.5mol/L NaOH 调至 pH = 12)介质的条件下测定可见光区的吸收光谱(用岛津 UV-240 分光光度计)和荧光发射光谱(用日立 850 荧光光度计)。

1.5 分子量测定 将纯化的各藻胆蛋白分别经 Sephadex G-100 凝胶柱 (1.2 × 90cm) 层析, 用 0.05mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH = 7.0, 0.1mol/L NaCl) 平衡和洗脱, 以 Pharmacia 成套的蛋白质标准溶液作洗脱峰位置和洗脱体积的标准曲线, 查得各藻胆蛋白样品的分子量。

1.6 等电点测定 采用 7% 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳法 (上海植物生理学会, 1985)。pH 为 3.5—10。上槽液为 5% H₃PO₄ 溶液, 下槽液为 2% NaOH 溶液。

1.7 氨基酸分析 量取已知浓度的藻胆蛋白溶液 1.5ml 于小玻璃管中, 加入浓 HCl (12 mol/L) 1.5ml, 使 HCl 的浓度为 6mol/L; 封管, 110℃ 水解 24h; 水解液加少量蒸馏水, 过滤除去残渣, 在水浴上蒸干, 定容, 用日立 835-50 氨基酸分析仪测定。

2 结果与讨论

2.1 藻胆蛋白的吸收光谱和荧光发射光谱 荧光发射光谱的测定结果(图 1、图 2)如下。

(1) 在中性介质 (pH = 7) 中, 无论用 550nm 或 615nm 波长激发, RPC 的荧光发射光谱都是 641nm; 用 498nm, 540nm 或 565 nm 波长激发, RPE 的荧光光谱都是 578nm; 用 620nm 或 650nm 波长激发, APC 的荧光光谱都是 663nm。

(2) 用 0.5 mol/L HCl 调至 pH = 3 或用 0.5mol/L NaOH 调至 pH = 12 后, 无论采用何种波长的光激发, RPC, RPE 和 APC 3 种藻胆蛋白都无荧光发射光谱。

根据 O'Carra 等报道(1976), RPC 的辅基由藻蓝胆素 (Phycocyanobilin, PCB) 和藻红胆素 (Phycoerythrobilin, PEB) 组成; RPE 的辅基由藻红胆素和藻尿胆素 (Phycourobilin, PUB) 组成; APC 的辅基由藻蓝胆素组成。藻胆色素由于与不同的脱辅基蛋白相连而呈现不同的蛋白调节类型, 因而, 天然藻胆蛋白的光谱性质是由所含藻胆色素与脱辅基蛋白两者作用的结果决定的。在 RPC 的吸收光谱中, 550nm 的吸收峰为蛋白调节的 PEB 所引起的; 615nm 吸收峰为蛋白调节的 PCB 引起的。当用 HCl 调至 pH = 3 使 RPC

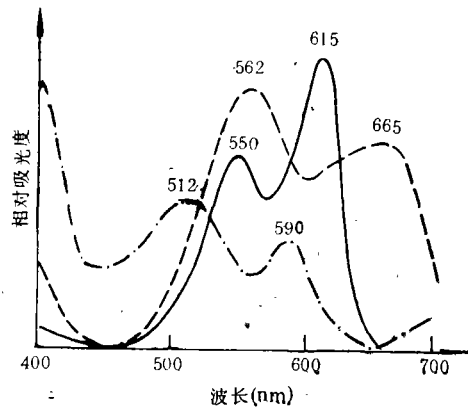


图 1 坛紫菜中 R-藻蓝蛋白的吸收光谱
Fig. 1 Absorption spectra of RPC from *P. haitanensis*

—在中性介质中; ---在酸性介质中;
- · - · - 在碱性介质中。图 2 同。

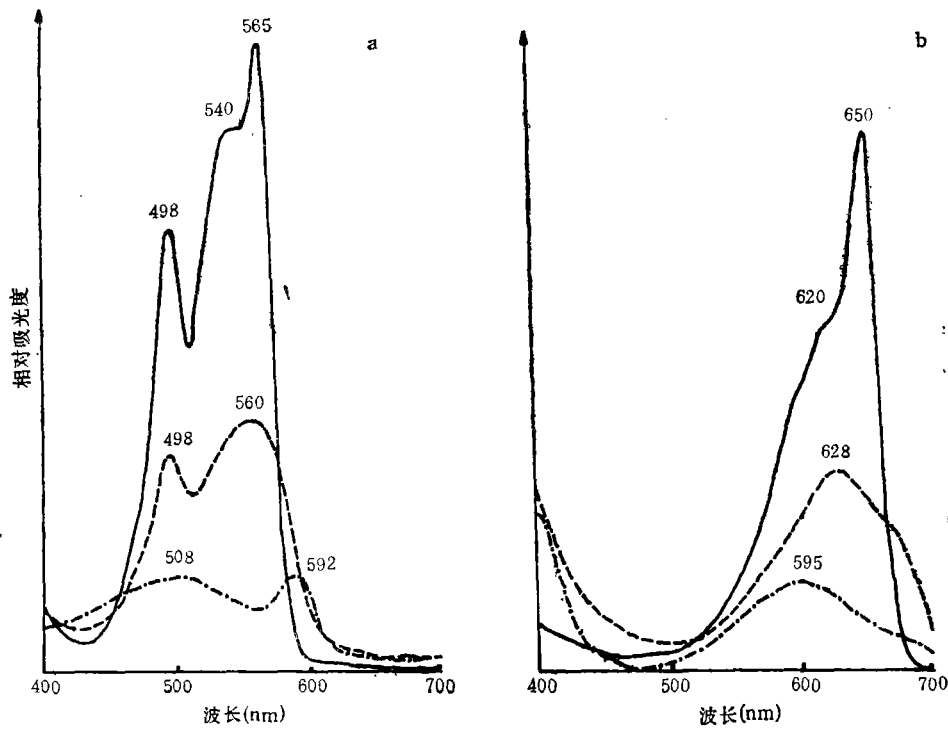


图 2 坛紫菜中 R-藻红蛋白(a)和变藻蓝蛋白(b)的吸收光谱

Fig. 2 Absorption spectra of RPE (a) and APC (b) from *P. haitanensis*

变性后,其吸收峰分别移至 562nm 和 665nm。在 APC 的吸收光谱中,650nm 的吸收峰是与 RPC 中不同的另一种蛋白调节的 PCB 所引起的;620nm 的吸收肩可能是 650nm 吸收的 PCB 的整体特点,或者是 615nm 吸收的 PCB 残余部分所派生的结果;当酸化至 $\text{pH} = 3$ 时,吸收峰移至 628nm。在 RPE 的吸收光谱中,565nm 和 540nm 的吸收是两种蛋白调节的 PEB 所引起的;498nm 的吸收是由 PUB 所引起的。当 pH 调至 3 时,565nm 和 540 nm 的吸收合并成 560nm 的吸收峰,而 498 nm 的吸收峰不动,这两个吸收峰恰是 PEB 和 PUB 所特有的吸收峰。

用 0.5 mol/L HCl 调至 $\text{pH} = 3$ 或用 0.5 mol/L NaOH 调至 $\text{pH} = 12$ 后,无论采用何种波长的光激发,RPC,RPE 和 APC 3 种藻胆蛋白都无荧光发射光谱。这说明,经酸或碱处理后,色素的构型或构象发生了变化,色素周围的蛋白质结构被破坏,使藻胆蛋白原有的荧光消失。

由两种不同聚集体的 RPE 在中性介质中测定的吸收光谱和荧光发射光谱可见图 3。

大分子 RPE 的吸收光谱和分离前 RPE 的相同。小分子 RPE 的 498nm 峰和 540nm 吸收肩与分离前 RPE 的相同,但 565nm 峰移至 555nm,向短波方向移动了 10nm,且强度明显减弱,几乎和 540nm 吸收肩相同。两者的荧光光谱也有所差异,采用 498nm,540nm 和 565nm 的波长激发,大分子 RPE 的荧光光谱峰都为 578nm,和分离前 RPE 相同;而小分子 RPE 为 575nm,向短波方向移动了 3nm。Van der Velde (1973) 认为,小分子 RPE

是由大分子 RPE 发生解聚的产物, 这种解聚是不可逆的。由此可见, 聚集体发生解聚可导致吸收光谱和荧光光谱峰向短波方向移动。由于大分子 RPE 的光谱性质与分离前 RPE 的相同, 小分子 RPE 的存在并没有改变原 RPE 的光谱性质, 说明只有一小部分 RPE 发生解聚。早期的研究表明, RPE 的光量子吸收由 PUB 传到 540 nm 型的 PEB, 再高效率地传到 565 nm 型的 PEB; 540 nm 和 565 nm 的 PEB 分别称为敏化 (s)-PEB 和荧光 (f)-PEB (O'Carra, et al., 1976)。在本工作的小分子 RPE 的吸收光谱中, 565 nm 峰移至 555 nm, 表明大分子 RPE 在解聚过程中, f-PEB 同蛋白之间可能发生了微环境的变化, 从而导致发色团整体结构的变化, 也即 f-PEB 比 s-PEB 更易受解聚过程的影响。

2.2 藻胆蛋白的分子量 通过 Sephadex G-100 凝胶过滤方法, 测得 RPC 的分子量为 117 000, APC 的分子量为 122 000; 小分子 RPE 和大分子 RPE 的分子量分别为 38 000 和 232 000。据 O'Carra 等(1976)报道, RPC 在 pH = 6.5 时测得分子量为 134 000; pH 低于 6.5 时, RPC 分子发生二聚形成分子量为 262 000 的聚集体。由于本工作是在 pH = 7.0

进行测定的, 分子量与 134 000 较为接近。Mizuno 等(1982)对日本产甘紫菜 (*P. tenera*) 和条斑紫菜 (*P. yezoensis*) 的 RPC 用超速离心沉降平衡法测得分子量分别为 251 000 和 265 000。与 RPC 不同的是, APC 在很宽的 pH 值范围内只存在一种聚集体, 其文献报道的分子量范围为 96 000—134 000 (O'Carra, et al., 1976)。RPE 在 pH = 3—10 范围内稳定, 但在碱性介质中分子则断裂成较小单位。多管藻 (*Polysiphonia urceolata*) 中的 RPE, 用 Sephadex G-200 凝胶过滤方法测定其分子量, 发现存在两种不同的聚集体, 分子量分别为 332 000 和 500 000 (马金石等, 1981)。条斑紫菜的 RPE 中也存在两种不同的聚集体, 用同样的凝胶过滤法测得的分子量分别为 330 000 和 79 000, 而用超速离心沉降平衡法测定的分子量分别为 226 000 和 39 000, 都比凝胶过滤法的测定值低 (曾繁杰等, 1986)。由此可见, 在不同条件下用不同的方法测得的分子量不尽一致, 说明藻胆蛋白的聚集状态与环境条件 (如 pH 值、离子强度、蛋白质浓度等) 有密切的关系。

2.3 藻胆蛋白的等电点和氨基酸组成 应用等电聚焦电泳法测得 RPC, APC 的等电点分别为 4.62 和 4.42; 小分子 RPE 和大分子 RPE 的等电点分别为 4.52 和 4.83。从两种 RPE 的等电点的不同可以看出, 藻胆蛋白发生解聚, 改变了多肽链上活性酸碱基团的相对比例, 从而导致了等电点的差异。

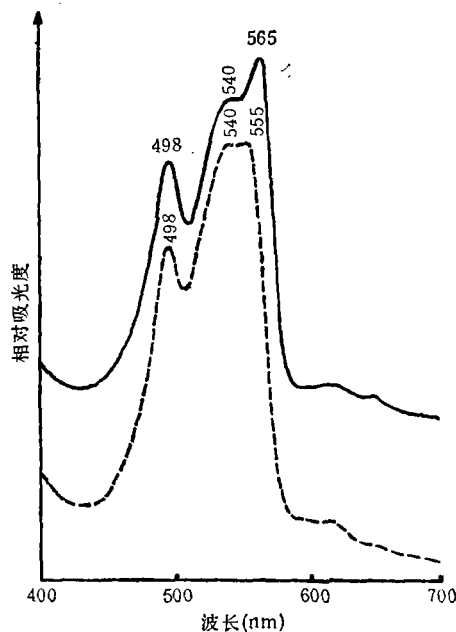


图 3 坛紫菜中两种 R-藻红蛋白在中性介质中的吸收光谱

Fig. 3 Absorption spectra of two types of RPE from *P. haitanensis* in neutral medium

— 大分子聚集体的 R-藻红蛋白; ---- 小分子聚集体的 R-藻红蛋白。

3 种藻胆蛋白的氨基酸分析结果见表 1。可以看出,在 RPE 和 RPC 中都是以丙氨酸含量为最高,亮氨酸和缬氨酸次之。而在 APC 中是以亮氨酸和异亮氨酸含量最高,其次才是丙氨酸和缬氨酸。但 3 种藻胆蛋白的共同特点,都是以丙氨酸、亮氨酸、缬氨酸等具有疏水基团的氨基酸为主要组分。而且各藻胆蛋白中所含的酸性氨基酸(天冬氨酸和谷氨酸)总量都大于碱性氨基酸(精氨酸、赖氨酸和组氨酸)的含量。从测得的等电点偏酸性即说明了这个特点。另外,在 RPC 中未测出脯氨酸;APC 中未测出酪氨酸。这可能是含量较低所致,在 APC 中缺乏组氨酸也与一般报道一致。

表 1 坛紫菜中藻红蛋白(RPE),藻蓝蛋白(RPC)和变藻蓝蛋白(APC)的氨基酸组成

Tab. 1 Comparison of the amino acid compositions of RPE, RPC and APC from *P. haitanensis*

氨基酸	藻胆蛋白中氨基酸的含量(%)		
	RPE	RPC	APC
天冬氨酸	6.56	5.87	7.03
苏氨酸	5.91	5.79	6.78
丝氨酸	7.08	8.07	6.50
谷氨酸	3.19	4.96	3.09
甘氨酸	4.88	6.81	5.35
丙氨酸	10.77	12.44	7.68
缬氨酸	10.03	9.08	7.62
蛋氨酸	0.88	0.55	0.87
异亮氨酸	6.69	7.36	8.67
亮氨酸	8.55	9.81	9.53
酪氨酸	0.90	0.26	—
苯丙氨酸	4.86	4.84	5.04
赖氨酸	4.82	4.38	5.33
组氨酸	0.60	0.19	—
精氨酸	2.41	1.46	2.93
脯氨酸	2.42	—	2.22
色氨酸	未测	未测	未测
酸性氨基酸	9.75	10.83	10.12
碱性氨基酸	7.83	6.03	8.26
总计	80.55	81.87	78.64

日本对甘紫菜中的 RPE 和 RPC 进行了氨基酸分析 (Fujiwara, 1956)。结果表明, RPE 以丙氨酸含量最高,天冬氨酸和丝氨酸次之;RPC 以天冬氨酸含量最高,丙氨酸和亮氨酸次之。对脐形紫菜 (*P. umbilicalis*) 中 3 种藻胆蛋白的氨基酸分析 (O'Carra, et al., 1976) 表明, RPE, RPC 和 APC 都是以丙氨酸含量最高,其次为天冬氨酸、谷氨酸和缬氨酸。纪明侯等(1981)对中国条斑紫菜的游离氨基酸和总氨基酸的分析表明,都是丙氨酸含量最高,其次为谷氨酸和天冬氨酸。这无疑反映了条斑紫菜中藻胆蛋白含量的。不同产地的紫菜氨基酸含量不尽一致¹⁾,江苏省吕四海产的和青岛海产的条斑紫菜以

1) 曾繁杰等,1985,中国坛紫菜和条斑紫菜中氨基酸的定量测定,第二届全国藻类学会会员大会暨学术年会论文摘要集,82—83。

丙氨酸含量最高,其次为谷氨酸和天冬氨酸,而福建省晋江海产的条斑紫菜和坛紫菜都是以谷氨酸含量最高。由此可见,氨基酸含量与生长海区、养殖条件等有密切关系。

参 考 文 献

- 上海植物生理学会,1985,植物生理学手册,上海科学技术出版社,484—486。
 马金石等,1981,多管藻中 R-藻红蛋白的分离和结构特征,科学通报,4:240—242。
 纪明侯等,1981,不同海区生长的条斑紫菜的氨基酸含量变化,海洋与湖沼,12(6):522—530。
 曾繁杰等,1986,1, R-藻红蛋白的物理和免疫化学性质,中国科学(B辑),4:364—368。
 Siegelman, H. W. et al., 1978, Algal biliproteins, In: Handbook of Phycological and Biochemical Methods, Cambridge University Press, pp. 72—79。
 O'Carra, P. et al., 1976, Algal bioproteins and phycobilins, In: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, 2nd ed, Vol 1, ed. by Goodwin, T. W. Academic Press (New York), 328—376。
 Van der Velde, H. H., 1973, Natural occurrence in red algae of two phycocrythrins with different molecular weights and spectral properties, Biochim. Biophys. Acta, 303(2): 246—257。
 Mizuno, H. N. Iso. et al., 1982, Identification of phycocyanin isolated from *Porphyra tenera* and *Porphyra yezoensis*, Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 48: 971—974。
 Fujiwara, T., 1956, Studies on chromoproteins in Japanese Nori, *Porphyra tenera* II. Amino acid compositions of phycoerythrin and phycocyanin, J Biochem. (Tokyo), 43: 195—203。

STUDIES ON CHEMICAL PROPERTIES AND COMPONENTS OF PHYCOBILIPROTEINS FROM *PORPHYRA* *HAITANENSIS**

Gao Hongfeng, Cao Wenda, Ji Minghou

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao 266071)

ABSTRACT

The extract of soluble pigment of *P. haitanensis* harvested in Qingdao Bay in 1988 was precipitated by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and then loaded on a hydroxylapatite column. Three types of phycobiliproteins, RPC, RPE and APC, were separated. The absorption spectra and room fluorescence emission of phycobiliproteins show no difference in neutral medium comparing with those reported formerly, but the absorption spectra in acidic or basic medium are more different from those in neutral medium, and fluorescence exhibiting in neutral medium disappeared.

Only one aggregate was separated from RPC and APC, but two aggregates were from RPE. The molecular weights of phycobiliproteins estimated on Sephadex G-100 column were: RPC 117 000, APC 122 000, small molecule RPE 38 000 and large molecule RPE 232 000. There are some differences in absorption spectra, fluorescent emission and isoelectric points between two aggregates of RPE. The amino acid composition of phycobiliproteins indicated that Ala, Leu and Val are the dominate components in RPE and RPC, while Leu, Ile and Ala are the dominate components in APC. The content of acidic amino acids is higher than of basic ones.

Key words *Porphyra haitanensis* Phycobiliprotein Chemical composition

* Contribution No. 1865 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.