

文章编号: 1000-5013(2011)06-0672-04

双水相萃取法富集分离地木耳中的藻蓝蛋白

甘林火

(华侨大学 化工学院, 福建 泉州 362021)

摘要: 采用聚乙二醇(PEG 4000)/硫酸盐双水相体系,经一次萃取从地木耳细胞破碎液中富集分离藻蓝蛋白.分别考察萃取时间、硫酸盐种类及浓度、PEG 4000 浓度、溶液 pH 值和离子强度对双水相萃取分离地木耳中藻蓝蛋白的影响.结果表明:在萃取时间为 30 min, Na_2SO_4 的质量分数为 15%, PEG 4000 的质量分数为 12%,加入 KCl 的质量分数为 1%, pH 值为 3.0 的最优条件下,藻蓝蛋白萃取率可达 95.2%,纯度为 4.8.

关键词: 地木耳; 藻蓝蛋白; 聚乙二醇; 双水相体系; 萃取

中图分类号: TQ 936.2; TQ 028.3⁺2

文献标志码: A

藻蓝蛋白(PC)是从藻类中分离出的一种深蓝色物质.它既是一种蛋白质,又是一种极好的天然食用色素,同时还是良好的保健食品,具有很高的营养价值和医疗价值^[1].传统的从蓝藻中提取分离藻蓝蛋白的方法多采用盐析沉淀法^[2-3],包括沉淀、离心和透析 3 个主要操作环节,这在实际工业化生产中存在操作步骤繁琐、动力能耗高及操作周期长等缺点. Albertsson^[4]于 20 世纪 50 年代后期开发了双水相萃取法.70 年代以后,双水相萃取技术在生物分离过程中得到广泛应用^[5],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,具有良好的发展前景.刘杨等^[6]研究了双水相萃取法从螺旋藻中分离提取藻蓝蛋白,萃取效率和分配系数均较高.地木耳(Nostoc)学名普通念珠藻,是陆生蓝藻中的一种,其蛋白含量高达 20%,且藻蓝蛋白丰富^[7].本文采用聚乙二醇(PEG 4000)/硫酸盐双水相体系,分离提取地木耳中的藻蓝蛋白.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

地木耳粉为自制(采自福建泉州华侨大学),聚乙二醇(PEG 4000,上海国药集团化学试剂有限公司), Na_2SO_4 (广东广州化学试剂分公司), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (广东汕头西陇化工厂),其余试剂均为分析纯.

超声波细胞粉碎机(浙江宁波新芝生物科技有限公司),高速低温离心机(德国赫姆勒实验室仪器),电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),四联磁力搅拌器(江苏金坛江南仪器厂),紫外可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司).

1.2 实验方法

1.2.1 地木耳细胞破碎 称取 2 g 地木耳粉于 100 mL 的磷酸盐缓冲液(PBS, pH=7)中,在超声波细胞粉碎机中破碎(冰浴条件下,全程时间 20 min,工作间歇时间 9 s,超声时间 6 s,温度保护 30 ℃).将破碎后的地木耳细胞悬浊液于 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4 ℃的冷冻离心机中离心 20 min 后取出抽滤,加入磷酸盐缓冲液定容至 400 mL,所得清液即为含有藻蓝蛋白的粗提液,测定其中的藻蓝蛋白质量浓度.

1.2.2 双水相萃取实验 量取 20 mL 粗提液于具塞锥形瓶中,加入定量 PEG 4000 和硫酸盐,常温下在磁力搅拌器上搅拌一定时间,取出溶液于分液漏斗中静置、分层,将上相溶液移至 10 mL 刻度试管

收稿日期: 2010-11-18

通信作者: 甘林火(1979-),女,讲师,主要从事天然产物和氨基酸的分离提取及制备的研究. E-mail: lhgan@hqu.edu.cn.

基金项目: 华侨大学科研基金资助项目(08X0211*)

中,测上相体积;同时采用可见分光光度法测定上下相溶液中藻蓝蛋白质量浓度.

1.2.3 藻蓝蛋白的测定与计算 藻蓝蛋白最大光吸收在 620 nm 附近,因此藻蓝蛋白质量浓度可根据 Kaplan 等^[8]采用的方法进行测定,即

$$\rho(\text{PC}) = (D(620) - 0.474D(650))/5.34.$$

(1)

式(1)中: $\rho(\text{PC})$ 为藻蓝蛋白的质量浓度($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); $D(620)$, $D(650)$ 分别为波长在 620,650 nm 处的光密度值.

藻蓝蛋白萃取率(η)和分配系数(K)的计算公式为

$$\eta = (\rho_t(\text{PC}) \times V_t / \rho_b(\text{PC}) \times V_o) \times 100\%,$$

(2)

$$K = \rho_t(\text{PC}) / \rho_b(\text{PC}).$$

(3)

式(2),(3)中: V 为溶液体积(mL);下标 o,t,b 分别代表藻蓝蛋白破碎,萃取后双水相体系上相和下相.

2 结果与讨论

2.1 萃取时间对萃取 PC 的影响

量取 20 mL 粗提液于具塞锥形瓶中,分别配制 12%的 PEG 4000 和 15%的 Na_2SO_4 ,与 PEG 4000 形成双水相体系^[9]. 常温下在磁力搅拌器上搅拌,考察萃取时间对双水相萃取法富集分离地木耳中藻蓝蛋白的影响. 实验结果表明:当萃取时间分别为 10,20,30,40 min 时,萃取率分别为 29.5%,48.3%,79.1%和 76.96%. 由此可知,随着萃取时间的增长,藻蓝蛋白萃取率先逐渐增大,在 30 min 后趋于稳定. 表明,30 min 时双水相萃取达到平衡,故萃取时间选为 30 min.

2.2 硫酸盐种类对萃取 PC 的影响

分别配制 12%的 PEG 4000 和 15%的 Na_2SO_4 双水相体系,12%的 PEG 4000 和 15%的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相体系. 常温下搅拌 30 min,考察双水相体系中不同硫酸盐对双水相萃取法富集分离地木耳中藻蓝蛋白的影响. 实验结果表明:当双水相组分为 Na_2SO_4 时,萃取率为 80.49%,分配系数为 4.580 3%;当双水相组分为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 时,萃取率为 74.54%,分配系数为 2.184 2%. 由此可见,无论是藻蓝蛋白的萃取率还是分配系数,含 Na_2SO_4 的双水相体系都要高于含 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的双水相体系. 综上所述,实验采用 PEG 4000/ Na_2SO_4 双水相体系来富集提取地木耳中藻蓝蛋白.

2.3 PEG 4000 质量分数对萃取 PC 的影响

分别配制不同质量分数的 PEG 4000 和 15%的 Na_2SO_4 双水相体系,常温下搅拌 30 min,考察 PEG 4000 质量分数($w(\text{PEG 4000})$)对分离藻蓝蛋白的影响,结果如表 1 所示. 从表 1 可以看出,随着 PEG 4000 质量分数的增大,藻蓝蛋白的萃取率呈现逐渐增大的趋势,而藻蓝蛋白的分配系数则是先增大后减小.

聚合物浓度是影响双水相萃取的重要因素之一. 随着 PEG 4000 浓度的增大,双水相体系离成相临界点的距离增大,系线长度增加,两相性质的差别(疏水性等)增大,界面张力也随之增大,水溶性的藻蓝蛋白越容易分配到一相中去. 因此,藻蓝蛋白的萃取率在不断提高. 但是,上相体积也在逐渐增大,分配系数就不是单调变化的. 结合 η 和 K 值进行综合分析,实验选取 PEG 4000 质量分数为 12%的双水相体系.

2.4 Na_2SO_4 质量分数对萃取 PC 的影响

分别配制不同质量分数的 Na_2SO_4 和质量分数为 12%的 PEG 4000 双水相体系,常温下搅拌 30 min. 考察 Na_2SO_4 质量分数($w(\text{Na}_2\text{SO}_4)$)对集分离藻蓝蛋白的影响,结果如图 1 所示. 从图 1 可见,随着 Na_2SO_4 质量分数的增大,藻蓝蛋白的收率呈先增大后减小的趋势,但总体变化不显著. 在 PEG/ Na_2SO_4 双水相体系中, Na_2SO_4 质量分数选取 15%.

2.5 离子强度对萃取 PC 的影响

2.5.1 NaCl 质量分数对萃取 PC 的影响 配制质量分数为 12%的 PEG 4000 和 15%的 Na_2SO_4 双水

表 1 PEG 4000 质量分数对萃取 PC 的影响

Tab.1 Effect of mass fraction of PEG 4000 on extraction of PC

$w(\text{PEG 4000})/\%$	V_t/mL	$\eta/\%$	K
6	4.2	53.56	8.371 9
8	5.0	67.45	10.297 8
10	5.8	75.82	11.292 7
12	6.6	79.36	9.570 4
15	7.4	84.68	6.182 5

相体系,分别加入不同质量分数的 NaCl 于溶液中,常温下搅拌 30 min. 考察 NaCl 质量分数($w(\text{NaCl})$)对分离藻蓝蛋白的影响,结果如图 2 所示. 从图 2 可知,当 NaCl 质量分数增大时,在实验选取的范围内,藻蓝蛋白的萃取率有所降低且降幅较小,最大降幅在 10% 左右.

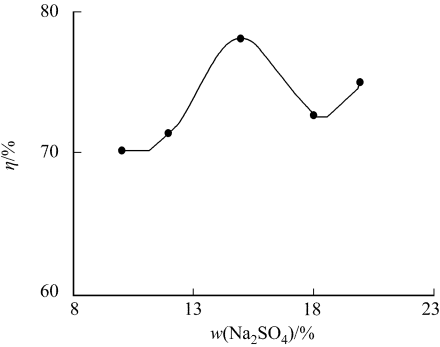


图 1 Na_2SO_4 质量分数对萃取 PC 的影响
Fig. 1 Effect of mass fraction of Na_2SO_4 on the extraction of PC

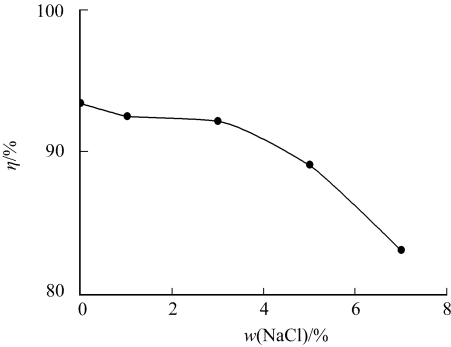


图 2 NaCl 质量分数对萃取 PC 的影响
Fig. 2 Effect of mass fraction of NaCl on extraction of PC

2.5.2 KCl 质量分数对萃取 PC 的影响 配制质量分数为 12% 的 PEG 4000 和 15% 的 Na_2SO_4 双水相体系,分别加入不同质量分数的 KCl 于溶液中,常温下搅拌 30 min. 考察 KCl 质量分数($w(\text{KCl})$)对分离藻蓝蛋白的影响,结果如图 3 所示. 从图 3 可知,当 KCl 质量分数增大时,在实验选取的范围内,藻蓝蛋白的萃取率先增大后趋于稳定.

比较加入 NaCl, KCl 对 PEG/ Na_2SO_4 双水相体系萃取分离地木耳中藻蓝蛋白过程的影响,出现了 2 种不同的结果. 由于实验采用的缓冲溶液是由 Na_2HPO_4 和 NaH_2PO_4 配制而成的,加入 NaCl 后, Na^+ 对含缓冲溶液的粗提液有盐析的作用,而使藻蓝蛋白的萃取率有所降低;而加入 KCl 后, K^+ 对含缓冲溶液的粗提液有盐溶的作用,而使藻蓝蛋白的萃取率先增大后趋于稳定.

2.6 pH 值对萃取 PC 的影响

选用 pH 值为 3~8 的粗提液进行实验,考察 pH 值对双水相萃取法富集分离地木耳藻蓝蛋白的影响,结果如图 4 所示. 从图 4 可知,在 pH 值为 3~5 时,藻蓝蛋白的收率逐渐降低;在 pH 值为 5~8 时,藻蓝蛋白的萃取率逐渐增大;当 pH 值为 5 时,萃取率出现最小值.

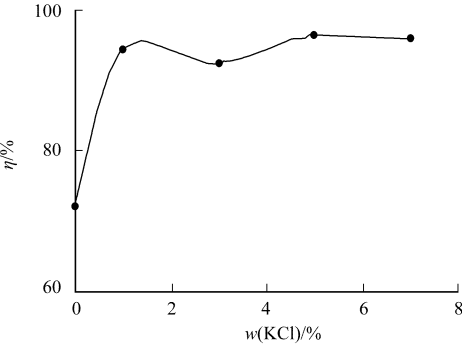


图 3 KCl 质量分数对萃取 PC 的影响

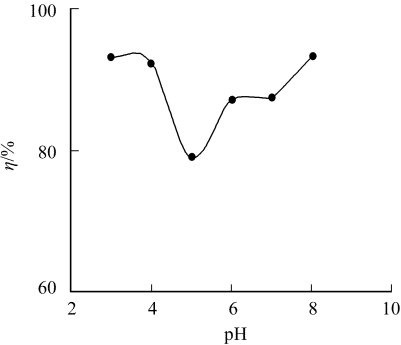


图 4 pH 值对萃取 PC 的影响

Fig. 3 Effect of mass fraction of KCl on extraction of PC Fig. 4 Effect of pH value on extraction of PC

在双水相体系中, pH 值是影响双水相萃取的重要因素之一. 由于蛋白质在溶液中有两性电离现象. 当 $\text{pH}=\text{pI}$ (等电点) 时, 该蛋白质极性基团解离的正负离子数相等, 净电荷为零. 在某一 pH 值的溶液中, 当 $\text{pH}>\text{pI}$ 时该蛋白质带负电荷; 反之, $\text{pH}<\text{pI}$ 时该蛋白质带正电荷. 当蛋白质在等电点时, 蛋白质分子以双极离子存在, 总净电荷为零, 颗粒无电荷间的排斥作用, 易凝集成大颗粒, 因而最不稳定, 溶解度最小, 易沉淀析出. 藻蓝蛋白的 pI 值在 4~5 之间^[10], 因此, 在 $\text{pH}=5$ 左右时藻蓝蛋白溶解度减小, 最终导致藻蓝蛋白萃取率降低, 出现最小值.

2.7 最优工艺条件的藻蓝蛋白纯度

藻蓝蛋白的纯度一般采用紫外可见分光光度法测定, 以 $D(620)$ 与 $D(280)$ 的比值来表示. 综上所述

述,在萃取时间为 30 min,PEG 4000 质量分数为 12%, Na_2SO_4 质量分数为 15%,加入 KCl 质量分数为 1%,pH 值为 3.0 的最优工艺条件下,利用 PEG 4000 和 Na_2SO_4 双水相体系对地木耳中藻蓝蛋白进行富集分离,其萃取率为 95.2%。采用该法测定富集相中藻蓝蛋白的纯度,结果可达 4.8,达到了普遍认可的商业化标准。

3 结束语

采用 PEG/ Na_2SO_4 双水相体系萃取分离地木耳中藻蓝蛋白,具有含水量高,不会引起生物活性物质失活或变性^[11],易于工艺放大和连续操作,与后续提纯工序可直接相连接而无需进行特殊处理,不存在有机溶剂残留问题,对人体无害等突出的优点,同时具有分离和浓缩的效果。由此可见,工艺具有良好的工业开发前景。

参考文献:

- [1] 李三相,张海林,杨亚军. 地木耳中藻蓝蛋白的分离与纯化[J]. 天水师范学院学报,2008,28(2):38-39.
- [2] PATEL A, MISHRA S, PAWAR R, et al. Purification and characterization of c-phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat[J]. Protein Exp Purif, 2005, 40(2): 248-255.
- [3] 王勇,钱凯先,董强. 高纯蓝蛋白分离纯化及光谱特性研究[J]. 生物化学与生物物理进展,1999,26(5):457-460.
- [4] ALBERTSSON P A. Partition of cell particles and macromolecules[M]. 2nd ed. New York: Wiley and John Sons, 1986.
- [5] 谢海. 双水相萃取技术研究现状[J]. 化学工业与工程,2006,23(5):463-465.
- [6] 刘杨,王学青,庞广昌,等. 双水相萃取法富集分离螺旋藻藻蓝蛋白的研究[J]. 海洋科学,2008,32(7):30-32.
- [7] 陈钧辉,陶力,李俊,等. 生物化学实验[M]. 北京:科学出版社,2003.
- [8] KAPLAN D, CALVERT H E, PETERS G A. The azolla-anabaena azollae relationship (Ⅲ): Nitrogenase activity and phycobiliproteins of the endophyte as a function of leaf age and cell type[J]. Plant Physiol, 1986, 80(4): 884-890.
- [9] 冯菁,夏杰,陆兵,等. 人溶菌酶的双水相萃取法分离[J]. 华东理工大学学报:自然科学版,2006,32(12):1409-1412.
- [10] 殷钢,刘铮,刘飞,等. 钝顶螺旋藻中藻蓝蛋白的分离纯化及特性研究[J]. 清华大学学报:自然科学版,1999,39(6):20-22.
- [11] 李夏兰,王丽娜. 用 PEG/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 双水相体系萃取糖化酶[J]. 华侨大学学报:自然科学版,1996,17(4):407-410.

Aqueous Two-Phase Extraction for Enrichment and Separation of Phycocyanin from Nostoc

GAN Lin-huo

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: Enrichment and separation of phycocyanin from nostoc cell homogenates was studied under polyethylene glycol (PEG 4000)/sulphate aqueous two-phase system by one step extraction. The effects of time, type and concentration of sulphate, the concentration of PEG 4000, ionic strength and pH value on the extraction behavior were investigated respectively. The optimized extraction rate of phycocyanin from nostoc was 95.2% and reached the purity of 4.8, and the optimum conditions for extraction were extraction time of 30 min, Na_2SO_4 mass fraction of 15%, PEG 4000 mass fraction of 12%, KCl mass fraction of 1% with pH value of 3.0.

Keywords: nostoc; phycocyanin; polyethylene glycol; aqueous two-phase system; extraction

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 刘源岗)