

酒石酸钾钠双水相体系分离纯化 C-藻蓝蛋白

赵丽^{1,2}, 彭一良², 康天², 蔡伟民¹

(1. 哈尔滨工业大学 市政环境工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150080; 2. 哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150025)

摘要: 采用廉价的聚乙二醇(PEG)/酒石酸钾钠建立双水相体系, 从干螺旋藻中分离纯化藻蓝蛋白 C-PC。以纯度(目的蛋白在 620 nm 处的特征吸光值和总蛋白在 280 nm 处吸光值的比值)为指标, 优化体系参数。研究表明, 体系 pH 8.06, 系统线长为 21.65%、体积比为 0.22 的 PEG1000 和酒石酸钾钠双水相体系分离纯化效果最好, 纯度由 0.42 提高到 1.27, 高于食品级纯度 0.7, 纯化因子 3.04, 回收率 85.11%。硫酸铵盐析提高粗提液纯度后, 二次双水相纯度达到 3.28, 高于药品级 3.0。得到的 C-PC 具有较高的生物活性。

关键词: C-藻蓝蛋白; 纯度; 酒石酸钾钠; PEG1000; 双水相

中图分类号: Q81, Q51

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2015)09-0010-06

doi: 10.11759/hyxx20140912001

双水相(Aqueous two-phase systems, ATPS)是一种新型的分离纯化技术^[1]。体系中的两相都是水溶液, 操作条件温和^[2], 系统的含水量高达 75%~90%, 为亲水性很强的生物物质提供了适宜的环境, 而且不会引起生物物质的失活和变性。因此, 双水相技术已广泛的应用于生物化学、细胞生物学、生物化工等物质分离提纯领域^[3-4]。但由于传统双水相的原料聚乙二醇和葡聚糖成本太高, 目前真正工业化的例子还很少。

藻蓝蛋白(C-phycocyanin, C-PC)是一种水溶性蓝色荧光蛋白, 广泛存在于蓝藻中。C-PC 一般由等摩尔的 α 和 β 亚基聚合构成, 每个 α 亚基或 β 亚基含有至少 1 个直链四吡咯化合物的藻胆素(Phycobilins)发色团^[5], 使 C-PC 呈现鲜亮的蓝色, 因此 C-PC 常作为天然色素应用于食品、添加剂和化妆品领域^[6]。此外, 由于 C-PC 还具有高效的荧光特性, 也广泛应用于医药保健领域、化学光敏剂, 以及荧光分析等领域^[7]。藻蓝蛋白纯化工艺复杂、成本高、步骤繁多、回收低, 导致天然藻蓝蛋白的市场价格高达 50 美元/mg^[8]。螺旋藻是国内外的一种经济型蓝藻, 年产高于 2 000 t。螺旋藻的蛋白质含量可达干重的 70%以上, 其中, 藻蓝蛋白的含量超过 20%^[9], 因此, 常被作为提取 C-PC 的首选蓝藻。国内、外通常采用新鲜的螺旋藻作为提取原料。近年来, 国内已开始选用干藻粉作为提取 C-PC 原料。

分离纯化藻蓝蛋白的主要方法是进行多级色谱

柱层析^[10-11]。其操作步骤繁多、产量少^[12-13], 不适用于工业化生产。近年来, 双水相萃取分离技术已开始被应用于藻蓝蛋白的分离纯化。国外学者应用 PEG4000/磷酸钾体系^[14], 获得了藻蓝蛋白的高纯度。但 PEG4000 黏度较高, 分相时间较长, 而且 C-PC 富集于 PEG4000 中, 高黏度增加了 PEG 去除的难度。国内学者应用 PEG2000/硫酸铵双水相体系获得藻蓝蛋白^[15], 但最终纯度较低仅达到 1.2。

本文采用廉价的 PEG1000/酒石酸钾钠双水相体系, 分离纯化 C-PC, 有效降低了体系黏度。研究双水相分离纯化规律, 分析分离萃取过程中, 各种条件因素的影响情况及相互作用关系, 从而优化双水相体系参数。实现高效、低成本、易操作的藻蓝蛋白提取, 为藻蓝蛋白能够得到广泛应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

干螺旋藻藻粉购买于中国海洋大学生命科学学院。

聚乙二醇、磷酸盐、硫酸铵、酒石酸钾钠等(分

收稿日期: 2014-09-12; 修回日期: 2015-05-12

基金项目: 黑龙江省自然科学基金面上项目(C201219)

作者简介: 赵丽(1976-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 生物有效物质提取, E-mail: lili_zhao_cc@126.com; 蔡伟民, 教授, 通信作者, 主要研究方向为生物材料应用, E-mail: wwwbll@sina.com

析纯)购买于国药集团化学试剂有限公司。UV-2102 PC 型紫外-可见分光光度计, 中国上海尤尼克公司; 台式高速冷冻离心机(TGL-16MI)长沙湘麓离心机有限公司。

1.2 方法

1.2.1 藻蓝蛋白的粗提液

准确称取 6 g 干螺旋藻藻粉, 溶于 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液, 混合均匀。采用反复冻融法: -20°C 冷冻, 室温融化, 反复冻融 6 次。10 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 4°C 保存备用。

1.2.2 双水相体系

选择 PEG/盐双水相体系。其中盐溶液分别为磷酸钾, 磷酸钠, 硫酸铵, 酒石酸钾钠。绘制体系相图, 根据相图计算配比, 选取不同体系组成。将不同配比与粗提液混合均匀, 4°C 静置, 分别记录上、下相分层情况, 上、下相体积, 取少量待测。

1.2.3 双水相系统参数

纯度^[12-14, 16-17](P): 目的蛋白在 620 nm 处的特征吸光值和总蛋白在 280 nm 处吸光值的比值。

纯化因子(F): 目的产物提纯后的纯度与粗提液纯度的比值。

分配系数(K): 目的蛋白在上相和下相浓度的比值。C-PC 易富集于上相 PEG 中。实验证明它在上相的浓度为 0.1 g/L 时, 在下相浓度是接近 0.001 g/L。因此下相 C-PC 的浓度可忽略。

系线长(TLL): 双水相系统的上相和下相的浓度总组成的关系。它通常反应了 ATPS 系统构成对分离材料的影响效果。

体积比(V_r): 体系上相和下相的体积比。

1.2.4 多次双水相

取一定量的上一次 ATPS 获得的 PEG 溶液, 按照一定的配比与一定量的同种盐溶液混合均匀, 4°C 静置, 分别记录上、下相分层情况, 上、下相体积, 取少量待测。其他参数保持和一次 ATPS 一致。

1.2.5 分析方法

采用紫外-可见分光光度计对上相溶液进行全波长扫描, 起始波长 260 nm, 终止波长 700 nm。记录不同波长处的吸光值。

采用荧光发射光谱测定 C-PC 的活性。荧光发射光谱的激发波长为 560 nm。扫描范围由 580 nm 到 770 nm。

数据分析运用 ORIGIN 8.5, MATLAB R2008a。

2 结果与分析

2.1 螺旋藻藻粉的细胞学形态

光学显微镜下观察螺旋藻的细胞学形态(10 倍)见图 1。可见藻段呈螺旋状。C-PC 粗提液纯度为 0.42。



图 1 螺旋藻藻粉的细胞学形态

Fig. 1 The morphology of the dry *spirulina platensis* powder

2.2 不同盐相对 C-PC 纯度的影响

在 TLL 为 $27\% \pm 1\%$ 、 V_r 为 1, PEG 分子质量一定的情况下, 比较不同的盐相(磷酸钠、磷酸钾、酒石酸钾钠、硫酸铵)对 C-PC 纯度的影响, 结果见图 2。C-PC 的等电点为 4.0。硫酸铵、磷酸钠、磷酸钾、酒石酸钾钠构成的双水相体系的 pH 均超过等电点(pH 分别为 4.80、5.85、6.80、8.06)^[16], 理论上这四种盐都适合 C-PC 的提取。因为盐相中正负离子的存在, 对体系中分子具有不同的亲和力, 并产生电位

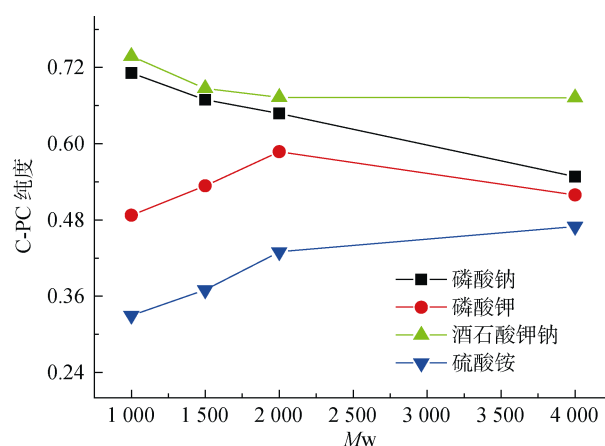


图 2 不同盐相对 C-PC 纯度的影响

Fig. 2 The influence of different salts phase on the purity of C-PC

差,因此,选择最佳的盐相对 C-PC 的提纯非常重要。PEG 分子质量从 1 000 到 4 000 的各双水相体系中,酒石酸钾钠构成的双水相体系对 C-PC 提取效果最好。可能是因为酒石酸钾钠可以更好的改变蛋白质的疏水性和相间电位的程度,从而影响蛋白质解离基团的解离度,提高了 C-PC 在上相 PEG 中的富集。所以选择酒石酸钾钠作为盐相,进行后续试验。

2.3 不同 PEG 分子质量对 C-PC 纯度的影响

在 V_r 为 1, TLL 为 21.65% 的 PEG /酒石酸钾钠双水相体系中,比较不同的 PEG 分子质量(1 000、1 500、2 000、4 000),对 C-PC 纯度的影响,以 C-PC 纯度为纵坐标,PEG 分子质量为横坐标,结果见图 3。PEG 1 000 体系提取效果最好。在图 2 中, TLL 为 27%±1%时,也得到同样的结果:PEG 1000 体系提取效果最好。PEG 分子端具有很多游离的具有一定亲水性的羟基。在 PEG 相组成一定时,PEG 分子质量的增加,分子链长增加,双水相体系中游离羟基的数量减少,分子内极性基团的比重相对降低,极性减小,从而富含 PEG 的上相的亲水性减小。C-PC 是一种高亲水性蛋白,低分子质量的 PEG 有利于亲水性的 C-PC 到达富含 PEG 的上相。此外,PEG 分子质量的减小,会使体系黏度降低,空间阻力减小,界面张力减小,蛋白在相间的传递及在相中的扩散阻力大大减小,C-PC 分子远离界面,更易进入上相 PEG,从而导致 C-PC 纯度增加。PEG 1 000 的提取效果最好,基本符合了分子质量越低越利于蛋白质富集的规律。

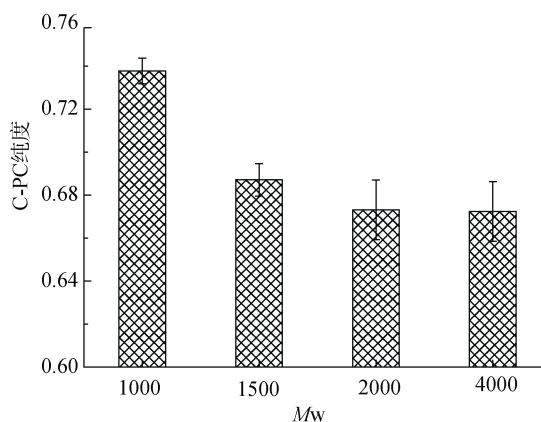


图 3 体系 PEG 分子质量对 C-PC 纯度的影响

Fig. 3 The influence of PEG molecular weight on the purity of C-PC

2.4 TLL 对 C-PC 纯度的影响

TLL 是双水相体系组成的关键因素,其中的每

个点都代表着不同 PEG 和盐的质量分数的组成成分。分子质量高于 10 000 亲水性蛋白,比较容易进入 TLL 小于 40%(质量分数)的双水相体系^[18]。因此在 PEG 1 000 和酒石酸钾钠双水相体系中,选择中、短的 TLL (质量分数): 14.66%、21.65%、26.51%、30.26%、33.47%。在 V_r 一定的情况下,比较不同 TLL 对 C-PC 纯度的影响,以 C-PC 纯度为纵坐标, V_r 为横坐标,结果见图 4。C-PC 的纯度与 TLL 呈现负相关。当 V_r 一定时,C-PC 的纯度随 TLL 的增加,呈下降趋势,即 TLL 越大,C-PC 的纯度越低。 TLL 为 14.66%时,其 C-PC 的纯度虽然最高,但其相分离的时间很长,因为 TLL 越小,越接近双结线,越接近临界值。 TLL 为 21.65%时,其 C-PC 的纯度仅略低于 TLL 为 14.66%,但相分离的时间较短,因此,选择 TLL 为 21.65%继续试验。

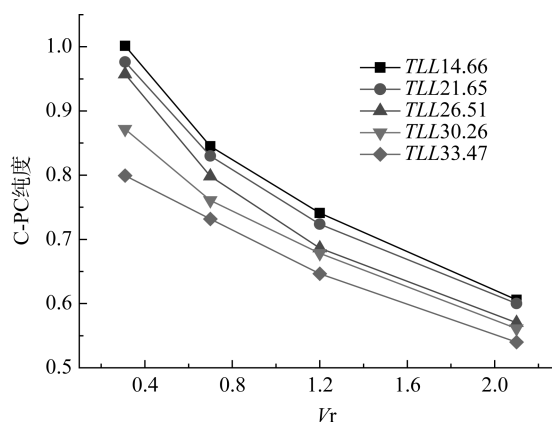
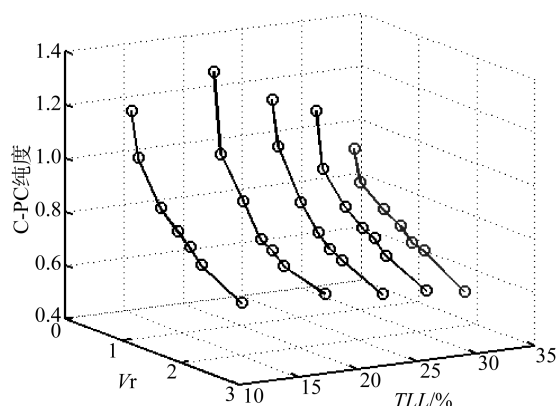


图 4 TLL 对 C-PC 纯度的影响

Fig. 4 The influence of TLL on the purity of C-PC

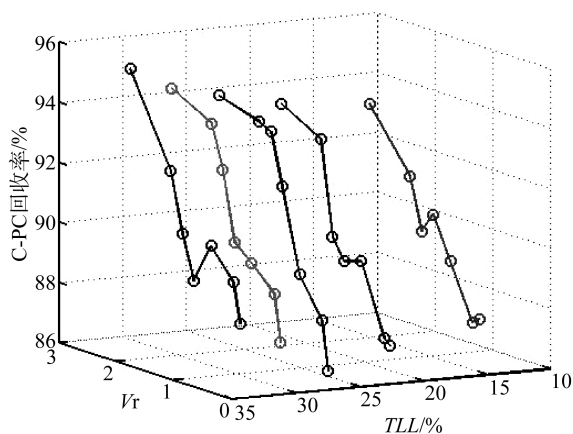
2.5 不同 V_r 对 C-PC 纯度的影响

V_r 对 C-PC 纯度的影响非常显著。在 TLL 一定的情况下,比较不同的上、下相体积比 V_r 对 C-PC 纯度的影响。以 C-PC 纯度为 Z 轴坐标, V_r 为 Y 轴坐标, TLL 为 X 轴坐标,结果见图 5。C-PC 的纯度与 V_r 呈现负相关。当 TLL 一定时,C-PC 的纯度随着 V_r 的减少,呈上升趋势即 V_r 越小,C-PC 的纯度越高。在 TLL 为 21.65%, V_r 为 0.22 时,C-PC 的纯度最高达到 1.27。 V_r 变小,即上相体积减少,使上相可利用空间减少,总蛋白的空间变小,非目的蛋白随着下相体积的增大,更多分配到下相,目的蛋白 C-PC 的纯度提高。其他藻也表现出相同的分离行为^[8]。但是与 PEG 4000 提取新鲜螺旋藻^[14]表现出行为正好相反。可能是因为 PEG 的分子质量的增大,影响了双水相体系的疏水性。

图5 V_r 对 C-PC 纯度的影响Fig. 5 The influence of V_r on the purity of C-PC

2.6 不同 TLL 和 V_r 对 C-PC 回收率的影响

不同的 TLL 和不同的 V_r 对 C-PC 回收率的影响。以 C-PC 回收率为 Z 轴坐标, V_r 为 Y 轴坐标, TLL 为 X 轴坐标, 结果见图 6。 V_r 对 C-PC 回收率的影响非常显著。在不同的 TLL 中, 回收率和 V_r 呈现明显的正相关, 随 V_r 的减少, 回收率呈下降趋势。在 TLL 33.47%, V_r 2.11 处 C-PC 的回收率最高达到 95.64%。在体系获得最高纯度 1.27, 回收率为 85.11%。虽然体系对 C-PC 的最大回收率在 TLL 为 33.47% 处获得, 但当 V_r 一定时, TLL 对回收率的影响并不显著。所有配比的回收率均高于 85%。

图6 系统 TLL 和 V_r 对 C-PC 回收率的影响Fig. 6 The influence of TLL and V_r on the yield of C-PC

2.7 不同相组成质量分数对 C-PC 纯度的影响

分别在不同 TLL 上选取不同 PEG1 000 和酒石酸钾钠相组成配比建立双水相体系, 确定最优组成。以

C-PC 纯度为 Z 轴坐标, PEG1 000 质量分数为 Y 轴坐标, 酒石酸钾钠质量分数为 X 轴坐标, 结果见图 7。 PEG1000 和酒石酸钾钠构建的双水相体系的质量分数分别为 7.76% 和 21%, pH 8.06, 系统长 21.65%、体积比 0.22 纯化效果最佳, 纯度由 0.42 提高到 1.27, 纯化因子 3.04, 回收率 85.11%。

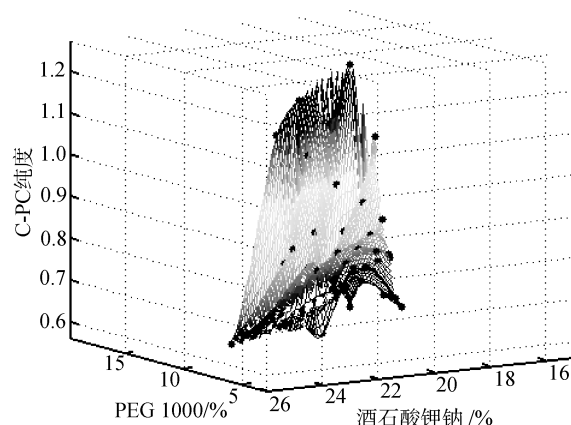


图7 相组成浓度对纯度的影响

Fig. 7 The influence of components in the ATPS on the purity of C-PC

2.8 多次 ATPS 对纯度的影响

硫酸铵盐析法, 提高粗提液纯度达到 1.46。选择上述最优条件, 建立 PEG/酒石酸钾钠双水相体系。按照一次 ATPS 配比, 建立多次 ATPS。以纯度作为 Z 轴坐标, 双水相体系萃取(ATPE)的次数作为 X 轴坐标, 结果见图 8。2 次 ATPE 萃取获得最高纯度 3.28, 明显高于 1 次、3 次和 4 次 ATPE 的萃取结果。

2.9 C-PC 的吸收光谱

采用紫外-可见光分光光度计对硫酸铵盐析、2

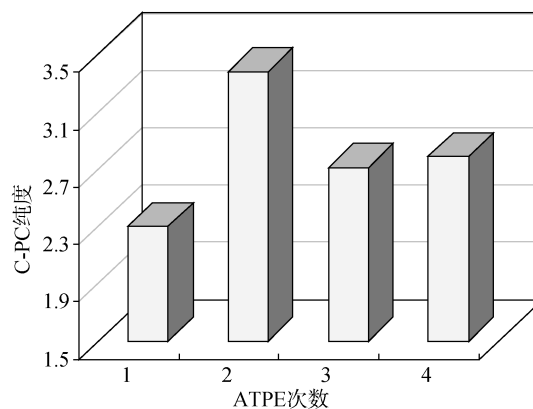


图8 多次 ATPS 对 C-PC 纯化因子的影响

Fig. 8 The influence of multiple ATPE stages on the purity of C-PC

次 ATPS 提取的 C-PC 进行全波长扫描, 起始波长 260 nm, 终止波长 700 nm, 结果见图 9。

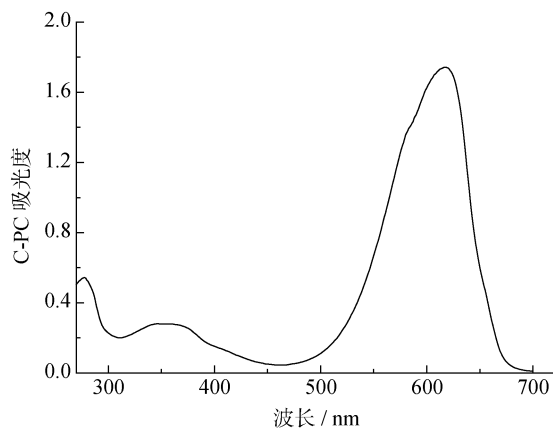


图 9 C-PC 的吸收光谱

Fig. 9 The absorption spectrum of the recovery C-PC

2.10 C-PC 的荧光测定

测定 2 次 ATPS 提取的 C-PC 的荧光光谱, 结果见图 10。C-PC 具有荧光, 峰值在 643 nm 获得。经过 ATPS 萃取提纯的 C-PC, 具有荧光, 在 643 nm 处获得峰值, 相对荧光强度 155.5, 具有的很好的生物活性。

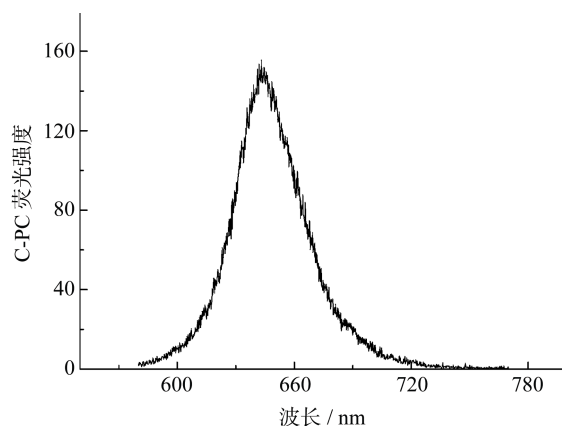


图 10 C-PC 的荧光发射光谱

Fig. 10 The fluorescence emission spectrum of the recovery C-PC

3 结论

采用廉价的 PEG1000/酒石酸钾钠双水相体系, 从干螺旋藻中分离纯化 C-PC。实验结果表明, 双水相体系浓度为 7.76% (w/w) 的 PEG1000、21%(w/w) 的酒石酸钾钠、 TLL 为 21.65%、 V_r 为 0.22, pH 为 8.06 时, 蛋白的纯度为 1.27, 回收率为 85.11%。硫酸铵盐

析法提高粗提液纯度, 经过 2 次 ATPS, C-PC 纯度可提高到 3.28, 高于药品级 3.0。获得的 C-PC 具有荧光, 生物活性良好。

参考文献:

- [1] Show P L, Tan C P, Shamsul A M, et al. Extractive fermentation for improved production and recovery of lipase derived from *Burkholderia cepacia* using a thermoseparating polymer in aqueous two-phase systems [J]. *Bioresour Technol*, 2012, 116: 226-233.
- [2] Naganagouda K, Mulimani V H. Aqueous two-phase extraction (ATPE): An attractive and economically viable technology for downstream processing of *Aspergillus oryzae* α -galactosidase [J]. *Process Biochem*, 2008, 43: 1293-1299.
- [3] Garza-Madrid M, Rito-Palomares M, Serna-Saldívar S O, et al. Potential of Aqueous Two-Phase Systems constructed on flexible devices: Human serum albumin as proof of concept [J]. *Process Biochem*, 2012, 45: 1082-1087.
- [4] Benavides J, Rito-Palomares M. Review practical experiences from the development of aqueous two-phase processes for the recovery of high value biological products [J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 2008, 83: 133-142.
- [5] Choi J W, Nam Y S, Kim J M, et al. Biomolecular photonic device consisting of Chl a/Chl b/phycoerythrin /phycocyanin hetero structure [J]. *Nanoscience and Nanotechnology*, 2006, 6(11): 3526-3531.
- [6] Yoshida A, Takagaki Y, Nishimune T. Enzyme immunoassay for phycocyanin as the main component of spirulina color in foods [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1996, 60: 57-60.
- [7] Bhat V B, Madyastha K M. Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: protection against oxidative damage to DNA [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 285: 262-266.
- [8] Benavides J, Rito-Palomares M. Potential Aqueous Two-Phase Processes for the Primary Recovery of Colored Protein from Microbial Origin [J]. *Life. Sci*, 2005, 5 (3): 259-266.
- [9] Ogbonda K H, Aminigo R E, Abu G O. Influence of

- temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp [J]. *Bioresour Technol*, 2007, 98: 2207-2211.
- [10] Kula M R, Kroner K H, Hustedt H. Adv. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction [J]. *Biochem. Eng*, 1982, 24: 73-118.
- [11] Ranjitha K, Kaushik, B D. Putification of phycobiliproteins from *Nostoc nuscorum* [J]. *Sci Ind Res*, 2005, 64: 372-375.
- [12] Anamika P, Sandhya M, Richa P, et al. Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat [J]. *Protein Exp. Purif*, 2005, 40: 248-255.
- [13] Patil G, Chethana S, Sridevi A S, et al. Method to obtain C-phycocyanin of high purity [J]. *Chromatogr A*, 2006, 1127: 76-81.
- [14] Patil G, Raghavarao K S M S. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycocyanin [J]. *Biochem Eng J*, 2007, 34: 156-164.
- [15] 于淑坤, 岳思君, 田露, 等. 聚乙二醇-硫酸铵双水相体系萃取螺旋藻藻蓝蛋白的研究[J]. *食品科技*. 2012, 11: 249-252.
- [16] Zhao L, Peng Y, Gao J, et al. Bioprocess intensification: an aqueous two-phase process for the purification of C-phycocyanin from dry *Spirulina platensis* [J]. *Eur. Food. Res. Technol*, 2014, 238 (3): 451-457.
- [17] 纪明侯. 海藻化学[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 489-493.
- [18] Cabezas, H. Theory of phase formation in aqueous two phase systems [J]. *Chromatogr B*, 1996, 680: 3-30.

Separation and purification of C-phycocyanin using aqueous two-phase extraction technique of potassium sodium tartrate

ZHAO Li^{1, 2}, PENG Yi-liang², KANG Tian², CAI Wei-min¹

(1. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150080, China; 2. College of Life Sciences and Biotechnology, Harbin Normal University, Harbin 150025, China)

Received: Sep., 12, 2014

Key words: C-phycocyanin; purity; potassium sodium tartrate; PEG1000; aqueous two- phase system

Abstract: This paper used commercial aqueous two-phase system (ATPS) to efficiently extract and purify C-PC from the dry *spirulina platensis*. The purity of C-PC was defined as the relation between of 620 and 280 nm absorbance, which was as the target to optimize the system parameters. The optimal conditions were proved in polyethylene glycol (PEG) 1000 and potassium sodium tartrate, system pH of 8.06, the tie-line length (TLL) of 21.65% (w/w) and the volume ratio (Vr) of 0.22 to increase the purity from the initial purity of 0.42 to 1.27 after the first extraction. The purity was over the food grade 0.7 and the purification factor was 3.04. The recovery yield was 85.11%. The purity was achieved up 3.28 after the saturation of ammonium sulfate in the second ATPS extraction. It was more than the pharmaceutical grade 3.0.

(本文编辑: 康亦兼)