基于 R-藻红蛋白及硫酸多糖提取的次等紫菜综合利用技术

冯建华1,牛建峰2,3,黄爱优2,3,王广策2,3

(1. 天津科技大学 海洋科学与工程学院, 天津 300457; 2. 中国科学院海洋研究所 实验海洋生物学重点实验 室, 山东 青岛 266071; 3. 南通中国科学院海洋研究所海洋科学与技术研究发展中心, 江苏 南通 226006)

> 摘要: 末水条斑紫菜以组织捣碎机粉碎,在 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.8)中反复冻融 3 次,收集上清 液,通过膨化床疏水层析技术分离 R-藻红蛋白 (R-PE),剩余残渣用于硫酸多糖提取。使用膨化柱分离, 粗提液中约17%的藻红蛋白可以被回收,DEAE-Sepharose 离子交换树脂纯化后,约12%的R-藻红蛋白得 到回收,光谱纯度大于 3.2,纯化得率为 0.66 mg/g 鲜紫菜。吸收光谱、荧光发射光谱以及凝胶电泳均显 示该藻红蛋白属于典型三峰型 R-藻红蛋白。利用藻红蛋白提取后的残渣,每克条斑紫菜可回收到 30.5 mg 的粗多糖,其中硫酸基含量为 21.8%。实验证明,微波辅助抽提与热水浸提对硫酸多糖得率无显著影响。 纯化的 R-藻红蛋白与紫菜硫酸多糖可用于食品、化妆品添加,或药品、保健品的开发。本文对探索次等 紫菜生物质的综合、高值化利用、进一步促进我国相关产品的开发与应用具有重要意义。

关键词:条斑紫菜; R-藻红蛋白;硫酸多糖;膨化床吸附;离子交换色谱 中图分类号: Q539; Q51 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2015)12-0077-09 doi: 10.11759/hykx20141017002

藻类多糖是构成藻类的主要成分之一,包括具 有微细纤维状结构的细胞壁多糖、无定形的细胞壁 间黏多糖以及细胞内的储存多糖。海藻硫酸多糖 (sulfated polysaccharide form seaweed, SPS)是普遍存 在于海藻中的一种大分子多糖,硫酸基通过取代糖 分子链中某些羟基而形成功能性活性分子。现有研 究均表明 SPS 在抗氧化、抗肿瘤、提高机体免疫力、 降血脂等方面显示出特有的生物活性^[1-2]。海藻硫酸 多糖还具有类似肝素的特性,能通过肝素辅酶 II 发 挥抗凝血作用。此外, SPS 还具有抗血栓及溶解血栓 的作用,性能优于目前临床应用的抗凝剂和溶栓剂。 因此,某些海藻硫酸多糖已表现出巨大的临床应用 前景^[3-4]。

紫菜多糖是其细胞主要组分之一,具有抗凝血、 降血脂、抗衰老及免疫调节等作用^[5-8]。南非紫菜多 糖能够通过降低小鼠 MDA 水平,直接清除体内自由 基而提高其抗氧化能力^[9]。Yoshizawa 等^[10-11]从条斑 紫菜中分离到具有激活巨噬细胞、增强免疫功能的 两种多糖组分。因而紫菜多糖是一种比较理想的可 被开发成抗衰老食品和药品的重要组分。另外,多糖 分子中存在大量羟基或羧基等极性基团,可以与水 分子形成氢键,表现出良好的吸湿和保湿性能^[12], 所以在医药、化妆品、农业等方面也具有广阔的应 用前景^[13]。

藻胆蛋白是一种水溶性色素蛋白,具有独特的 吸收光谱和荧光发射光谱,它的存在补充了叶绿素 的光吸收范围,拓宽了藻类对可见光的吸收,有利 于藻类对水生环境的适应。条斑紫菜藻红蛋白为 I 型 R-藻红蛋白,由于其独特的光谱特性、稳定性以 及较高的吸收系数和量子产额,可作为生化研究的 荧光探针而运用于细胞和生物大分子的标记^[14]。还 可以用作肿瘤治疗的光敏剂^[15-16],也有报道称其具 有免疫调节的作用^[17]。此外,藻胆蛋白还可作为天然 色素用于食品、化妆品的添加^[18-19],避免了化学合成 色素可能带来的毒性危害。

紫菜是一类具有重要经济价值的大型海藻,目前有几个种广泛栽培于东南亚沿海各国^[20]。据统计, 2006 年紫菜年产量约 1.8×10⁴t 干品,年产值估计约 13 亿美元^[21]。我国紫菜产业发展迅速,从分布区域

收稿日期: 2014-10-17; 修回日期: 2014-12-20

基金项目: 江苏省产学研前瞻性联合研究项目(BY2011188); 南通市 2014 年科技计划项目(AS2014008); 国家科技支撑计划项目 (No.2012BAC07B03); 国家海洋局公益项目 (No. 201105023-7, 201105008-2)

作者简介: 冯建华(1989-), 女, 陕西西安人, 硕士研究生, 研究方向为 藻类分子生物学, 电话: 022-60601305, E-mail: fengjianhua1989@163.com; 通信作者: 王广策, 博士生导师, 研究员, E-mail: gcwang@qdio.ac.cn; 电话: 86-532-82898574; 牛建峰, 硕士生导师, 副研究员, E-mail: jf_niu@qdio.ac.cn; 电话: 86-532-82898575

来看、长江以南以坛紫菜为主、主要集中在福建省和 广东省: 长江以北以条斑紫菜为主, 主要集中在江苏 省和山东省。江苏省的紫菜栽培业发展迅速、全省栽 培面积 2.2 ha(33 万亩)左右,从业人员 8 万左右,在南 通、盐城和连云港海区形成了我国条斑紫菜的主产区. 年产量 40 亿枚标准制品、行业总产值 20 亿元左右。 生产的紫菜在当地一次和二次加工后形成产品, 销往 世界各地、成为我国出口创汇的重要组成部分。然而、 在紫菜的采收和加工过程中,一些次等紫菜以及加工 过程中产生的废弃紫菜、往往作为垃圾处理、一方面 是巨大的浪费、另一方面也可能造成环境的污染。因 此,这些次等紫菜的高值化加工及其高附加值物质的 提取已经成为紫菜产业可持续发展的关键。本文利用 这些次等紫菜相继提取藻胆蛋白和紫菜多糖。有望实 现对紫菜生物质的综合、高值化利用, 对进一步促进 我国相关产品的开发与应用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

末水条斑紫菜(Pyropia yezoensis)2014 年 5 月由 南通海达水产食品有限公司提供。去除杂藻简单清 洗后,-20℃冷冻备用。

Phenyl-Sepharose(Streamline[™] Phenyl), DEAE-Sepharose, 及 Streamline[™] 层析柱 (Streamline[™] 25, 100×2.5 cm) 购自美国阿玛西亚公司(Amersham Biosciences Corp.)。

1.2 方法

1.2.1 藻红蛋白及硫酸多糖提取步骤

将15g末水条斑紫菜叶状体与300 mL 蒸馏水混 合,组织捣碎机粉碎,经反复冻融3次后,筛绢过滤, 收集上清液,用于藻红蛋白纯化。残渣再次加水,用 于紫菜多糖的提取。重复3次,以保证数据准确可信。

1.2.2 藻红蛋白的纯化

藻红蛋白提取缓冲液为 10 mmol/L 磷酸盐缓冲 液(pH 6.8), 1 mmol/L 蛋白酶抑制剂 PMSF, 依据公 式 Kursar^[22]测定粗提液中藻红蛋白浓度后, 加入固 体硫酸铵至终浓度为 0.5 mol/L, 采用反向上样的膨 化床吸附法(EBA 色谱)进行分离纯化, 具体操作步 骤参照文献[23]。洗脱液透析除盐后进行扫描光谱测 定, 计算藻红蛋白得率及光谱纯度(OD₅₆₅/OD₂₈₀)。分 离得到的藻红蛋白溶液再经 DEAE-Sepharose 离子交 换柱层析进行藻红蛋白的纯化, 具体实验步骤参照 文献[24]。洗脱之前, 首先用 4 mmol/L 醋酸钠溶液 (pH 4.5)去除藻蓝蛋白污染,依次采用及 1 mmol/L 醋酸钠(pH 4.2)及 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.8) 去除杂蛋白污染。洗脱液经透析,体积测量后进行扫 描光谱的测定。

1.2.3 藻红蛋白光谱测定

吸收光谱采用岛津紫外-可见分光光度计(SHIMA-DZU UV-1800,中国)测定,狭缝设定为2nm;荧光发射 光谱使用日立荧光光谱仪 F-4500(HITACHI,日本)测定, 狭缝设定为0.5nm。所有光谱测定均在室温下完成。

1.2.4 电泳分析

SDS-PAGE 参照 Schägger 等^[25]的方法进行。各步 骤得到的样本经浓缩, 与等体积电泳缓冲液混合后沸 水浴处理 5 min, 聚丙烯酰胺凝胶分离, 浓缩胶浓度 为 5%, 分离胶浓度为 12.5%, 各含质量分数为 0.1% SDS。上样量 30 μL, 常温下 50 V 恒压电泳。电泳完毕 后, 用含 0.2%的考马斯亮蓝 R-250 染色, 脱色, 拍照。

1.2.5 条斑紫菜多糖提取条件筛选

收集藻胆蛋白提取后的残渣,分别加入 10 倍体 积的 pH 分别为 6、7、8 的磷酸盐提取缓冲液 (1%), 于 105, 110 及 121℃提取 1, 2 和 3 h。筛绢过滤,收 集各提取液,采用蒽酮硫酸法测定总糖含量^[26]。

标准曲线的绘制:参考张杰等^[26]的方法,分别 准确配制葡萄糖系列标准溶液,浓度从 0 开始至 200 mg/L,梯度 20 mg/L,体积 2.0 mL。混匀后各管 分别加 0.2%的蒽酮-硫酸试剂 1.0 mL,迅速摇匀,冰 浴放置 10 min 后,于沸水浴中加热 8 min (从水浴沸 腾算起),取出,自来水冷却,625 nm 处测定吸收度。 得回归方程为 y=0.0172x + 0.2305, *R*²=0.9817。

样品测定:按实验结果将各样本稀释至合适浓 度。参照上述步骤测定各样本多糖含量。

1.2.6 硫酸基含量的测定

将同一提取条件获得的多糖粗提液合并,加入 适量活性炭,摇床震荡过夜脱色。旋转蒸发浓缩至原 体积的 1/3,加入 8 倍体积的乙醇,冰箱静置过夜, 离心收集沉淀,用乙醇洗涤 1 次后冷冻干燥,称质 量。称取一定量的沉淀用于硫酸基含量的测定。

标准曲线的绘制:参照 Verma 报道的比浊法^[27],准 确配制 0.00, 0.03, 0.06, 0.12, 0.24 g/L 的 SO₄²⁻标准硫酸 基系列溶液,各取 2 mL 于 1, 2, 3, 4 号试管中,在 0 号 试管中加 2 mL 蒸馏水作空白。依次加入 2.5 mL 浓度为 4 mol/L 的山梨醇, 0.5 mL 6mol/L 盐酸,最后加入 0.5 g BaCl₂2H₂O 固体粉末,震荡 5~10 min。紫外可见分光光 度计于 470 nm 处测它们的吸光度,得标准曲线。回归方 程: y = 2.0317x-0.0956; 回归系数: R² = 0.9765。

样品测定: 各样品加入盐酸至终浓度 2 mol/L, 于 100~105℃下密闭水解 2 h, 活性炭脱色, 滤液加 固体 BaCl₂2H₂O 粉末, 比浊法测定。

1.2.7 微波辅助抽提及超声辅助抽提

高压锅提取前,先以微波或超声仪进行前处理, 微波处理选择适当功率,使样本呈轻度煮沸状态, 处理时间为 30 min;超声处理功率设定为 120 W, 30min;其余步骤同上述优选得到的最佳热提取法。

2 结果

2.1 R-藻红蛋白的提取

如图 1a 所示, 条斑紫菜藻红蛋白粗提液吸收光

表1 不同硫酸铵浓度洗脱的藻红蛋白得率及纯度

注: 15g新鲜条斑紫菜用于藻红蛋白的提取

谱中, 565 nm 处藻红蛋白特征吸收峰明显低于 280 nm
处总蛋白吸收值, 说明粗提液中杂蛋白含量较高。根据 R-藻红蛋白得量公式 R-PE=155.8A_{498.5}-40.0A₆₁₄-10.5A₆₅₁ 及测得的体积^[22], 计算可得粗提液藻红蛋白得率为 5.3 mg/g 条斑紫菜(湿质量)。

粗提液经膨化柱分离,梯度硫酸铵洗脱,浓度 得率见表 1。扫描光谱如图 1b 至 1d 所示,藻红蛋白 3 个特征峰(498、545 和 565 nm)明显,与此同时,紫 外区蛋白吸收峰明显降低,说明藻红蛋白得到了有 效提纯。但在 620 nm 和 650 nm 处可见小的吸收峰, 意味着藻蓝蛋白及别藻蓝蛋白没有被有效地去除。 此外,光谱纯度(*A*565/*A*280)虽然得到了显著提高,但 依然低于藻红蛋白光谱纯度标准(3.2)。

Tab.1Quantity and purity of the eluates from the streamline column eluted with 0.20, 0.10 and 0.05 mol/L ammol/Lonium
sulfate

$(NH_4)_2SO_4 浓度(mol/L)$	体积(mL)	A_{280}	A_{498}	A_{565}	A_{614}	A_{620}	纯度 (A565/A280)	得量(mg)
0.20	42	0.172	0.304	0.456	0.073	0.069	2.65	1.86
0.10	37	0.211	0.536	0.762	0.081	0.077	3.61	2.97
0.05	55	0.353	1.067	1.509	0.11	0.104	4.27	8.89



图 1 藻红蛋白提取过程中吸收光谱

Fig.1 Spectra of the fractions collected during R-PE isolation from leafy gametophyte of *P. yezoensis*a. 粗提液; b. 0.2 mol/L 硫酸铵溶液洗提样品; c. 0.1 mol/L 硫酸铵溶液洗提样品; d. 0.05 mol/L 硫酸铵溶液洗提样品
a. crude extract in 0.5 mol/L (NH₄)₂SO₄; b. eluate with 0.20 mol/L (NH₄)₂SO₄; c. eluate with 0.10 mol/L (NH₄)₂SO₄; d. eluate with 0. 05 mol/L (NH₄)₂SO₄

疏水色谱得到的藻红蛋白提取液使用 DEAE-Sepharose 树脂进行离子交换色谱层析,用4 mmol/L 醋酸钠(pH 4.5)缓冲液去除大部分藻蓝蛋白及其他杂 蛋白污染后,藻红蛋白可通过含 NaCl 梯度(0~ 0.2 mol/L)的磷酸盐缓冲液(pH 6.8)洗脱得到。纯化得 到的藻红蛋白吸收光谱和荧光发射光谱如图 2。吸收 光谱中,位于 620 nm 处的肩峰已经不存在,说明藻 蓝蛋白已经和藻红蛋白得到了分离。其最大荧光发 射峰值位于 580 nm。这些数据与以往报道的结果完 全一致^[24]。光谱纯度达到了 4.2,符合藻红蛋白光谱 纯度标准(3.2)。

2.2 电泳分析

SDS-PAGE 的结果显示, 纯化的藻红蛋白可呈 现两条明显的蛋白条带。分别位于 33 kDa 和 20 kDa 处, 其中 33 kDa 的强度明显弱于 20 kDa 处, 分别代 表了 γ 亚基和 α、β 亚基。 30 kDa 及 45 kDa 可见 的隐约条带可能为几个亚基组成的复合体(图 3)。



图 2 藻红蛋白经离子交换柱纯化后的吸收光谱与荧光发射光谱 Fig.2 The absorption and fluorescence spectrum of purified R-PE from DEAE-Sepharose column



图 3 藻红蛋白分离纯化过程中各洗脱液的电泳分析 Fig.3 SDS-PAGE analysis of the fractions collected during the purification steps

泳道 1: 粗提液; 泳道 2: 0.20 mol/L 硫酸铵洗脱组分; 泳道 3: 0.10 mol/L 硫酸铵洗脱组分; 泳道 4: 0.05 mol/L 硫酸铵洗脱组 分; 泳道 5: 分子量标准; 泳道 6: 离子交换树脂纯化后的样品 Lanes: 1, crude extract; 2, eluate with 0.20 mol/L (NH₄)₂SO₄; 3, eluate with 0.10 mol/L (NH₄)₂SO₄; 4, eluate with 0. 05 mol/L (NH₄)₂SO₄; 5, molecular weight markers; 6, purified R-PE using ion-exchange chromatography

2.3 藻红蛋白回收率及纯度分析

藻红蛋白的回收率,以每步提取纯化步骤得到 的藻红蛋白的量与粗提液中藻红蛋白的量的比值表 示,其结果见表 2,用膨化柱分离藻体中的藻红蛋白, 其回收率可达 16.96%,而接下来的纯化步骤使回收 率变得更低,离子交换色谱纯化后,只有 12.3%的藻 红蛋白得到纯化。显然,纯化步骤的增加使得率降低, 但纯度则会升高。

565 nm 处的光吸收是藻红蛋白的特征吸收值, 而 280 nm 的吸收值则对应于总蛋白质的浓度。因此, *A*₅₆₅/*A*₂₈₀ 被认为是藻红蛋白纯度的一个很好的指标。 粗提液中,此比值仅为 0.52。经过膨化柱的疏水层析 操作,此纯度值上升到了 2.65~4.27,表明绝大部分 非藻红蛋白的物质已经被去除。接下来的离子交换 色谱,使得藻红蛋白的纯度值均高于 3.2 这一普遍接 受的纯度标准。

2.4 多糖提取条件筛选

如表 3 所示,提取液 pH 是影响条斑紫菜多糖提 取量的主要因素,在同一 pH 条件下,多糖得率与提 取温度呈正相关;与提取时间呈正相关,但不同的 pH 和不同的提取温度下,提取时间对条斑紫菜多糖 得率的影响大小不等。为此我们做了三因素四水平 正交试验,实验结果如下:

从极差结果分析来看,本实验因素存在显著性 顺序,初步得出对条斑紫菜硫酸多糖提取效率影响 最大的因素是 pH,其次是提取温度,提取时间影响 相对较小。根据单因子实验结果,采用 pH 6,温度 121℃,提取 2 次,每次 1h,为最优的紫菜多糖提取 条件,在此条件下,多糖提取率相对较高,且提取时 间较短。故在实际生产中,可使用此方案,这样可以 达到高产且缩短生产周期、减少能耗的要求。

表 2 R-藻红蛋白的纯化

Tab.2 Purification of R-phycoerythrin from P. yezoensis

组分	体积 (mL) A ₂₈₀	4	A_{498}	A ₅₆₅	A ₆₂₀	纯度	相对纯度		得率	回收率
		A1280				(A_{565}/A_{280})	(A_{565}/A_{498})	(A_{620}/A_{565})	(mg/g)	(%)
水溶性粗提液	1350	1.514	0.484	0.641	0.334	0.42	1.32	0.52	5.34	_
苯基琼脂糖凝胶洗脱液	—	—		—	—	2.65~4.27	1.41~1.50	0.15~0.07	0.91	16.96
DEAE 琼脂糖凝胶洗脱液	109	0.188	0.591	0.863	0.035	4.59	1.46	0.04	0.66	12.31

'—'表示该值未测定或难以测定

表 3 L₉(3⁴)的正交实验设计及极差分析结果

Tab.3 $L_9(3^4)$ orthobonal experiment design and result of extremely difference analysis

			因素	
7K 平	А		В	С
	pH		提取次数	温度(℃)
1	6		1	105
2	7		2	110
3	8		3	121
		因素		
实验号	A pH	B 提取次数	C 温度(℃)	提取量(mg)
1	6	1	105	10.38
2	6	2	110	13.92
3	6	3	121	18.12
4	7	1	110	5.10
5	7	2	121	12.12
6	7	3	105	8.58
7	8	1	121	5.46
8	8	2	105	5.28
9	8	3	110	7.26
K_1	70.68	34.86	40.38	
K_2	43.02	52.2	43.74	
K_3	29.94	56.58	59.52	
k_1	23.58	11.64	13.44	
k_2	14.34	17.4	14.58	
k_3	10.02	18.84	19.86	
R	13.56	7.26	6.36	
最佳条件	\mathbf{A}_1	B_3	C ₃	

天然提取的硫酸多糖组分复杂,分子较大,外 观呈灰白色,易溶于水,均一性差,常含有较多的蛋 白质,称为粗多糖。表 4 所示为不同提取温度及 pH 值下多糖的提取结果。多糖回收率用提取得到的多 糖占使用的新鲜条斑紫菜质量百分比来表示,硫酸 基得率为提取单位新鲜条斑紫菜所能得到的硫酸基 的质量,粗提物得率为每次提取得到的固形物质量 与新鲜的条斑紫菜质量的比值。结果如表 4 所示,硫 酸基得率及多糖回收率在 pH 为 6 时均明显高于 pH 7 和 pH 8 时的值。同一 pH 下,随着提取温度的升高, 多糖回收率及硫酸基得率均增加。采用 pH 6, 温度 121℃,提取2次,每次1 h 的条件,每克条斑紫菜可以 回收到 30.5 mg 的多糖,硫酸基得率为 6.66 mg/g,约占 多糖质量的 21.8%。但各条件下总粗提物得率无明显规 律,固形物中多糖含量约占 10%~25%, pH 6 提取条件 下多糖含量相对较高, pH 8 下的多糖含量较低。

表 4 不同 pH 和温度下紫菜多糖得率与硫酸基含量测定

Гаb.4	The determination	of polysaccharides	s yield and sulfate	e content at different	pH and temperature
-------	-------------------	--------------------	---------------------	------------------------	--------------------

提取条件	多糖得率(mg/g)	粗提物得率(mg/g)	粗提物中多糖含量(%)	硫酸基得率(mg/g)	多糖中硫酸基含量(%)
pH6, 105℃	24.5	113.0	21.7	2.90	11.8
pH7, 105℃	11.9	107.7	11.0	1.12	9.4
pH8, 105℃	9.8	80.7	12.1	0.90	9.2
pH6, 110℃	25.7	151.0	17.0	4.11	16.0
pH7, 110℃	14.1	154.7	9.1	1.71	12.1
pH8, 110℃	10.4	149.6	6.9	1.49	14.3
рН6, 121°С	30.5	123.1	24.8	6.66	21.8
pH7, 121℃	22.5	182.3	12.3	3.47	15.4
pH8, 121℃	15.9	148.7	10.7	2.88	18.1

2.5 微波辅助抽提与超声辅助抽提

结果显示,高压锅提取之前的微波处理,可以 提高第一次热提取的多糖得率,但后续得率降低, 因此,微波处理可以起到加速多糖提取及缩短热提 时间的作用。超声波处理与对照组无明显差异。

3 讨论

3.1 藻红蛋白分离与纯化

藻胆蛋白可以作为荧光探针用于生物、医学研 究以及疾病的诊断与治疗,也可以作为肿瘤光动力 治疗的光敏剂、食品着色剂等。国外的许多公司已 相继投资开发藻胆蛋白产品、且售价可观。目前、疏 水层析色谱(HIC)技术已经被广泛应用于血清蛋白、 核蛋白、激素、重组蛋白及酶等生物大分子的纯化^[28]。 这种层析方法机制复杂,对生物大分子的损害小, 活性保持良好。与离子交换色谱、亲和层析、或反 向色谱等技术相比较而言。HIC 是一种温和的分离纯 化方法^[28-29]。它最突出的优点是纯化速度快、产量 大、不需要常规色谱方法所要求的填料的平衡及粗 提液的预处理^[30]、是一种仅需一步操作就可以从粗 提液回收目的蛋白的技术、适合于从细胞裂解液或 匀浆中直接分离目标物质。使用此技术、目标蛋白直 接被膨化柱内的树脂吸附而得到分离和浓缩、简化 了后续的纯化程序、极大地减少了分离纯化的步骤 和时间^[31]、与此同时、得率和纯度则相应提高、这 同时也降低了藻胆蛋白分离纯化的成本。因此、我们 将疏水层析运用于膨化床分离,可以规模化的分离 纯化藻胆蛋白。粗略计算显示,运用文中报道的方法, 每天可分离得到克级的藻胆蛋白。而且一个完整的 分离过程仅需要 3.5 h,包括柱的平衡,30 min,上样, 60 min,清洗,50 min,洗脱 60 min。因而是一种有效 且快速的纯化藻胆蛋白的方法。

疏水层析利用的是填料分子与蛋白分子间的相 对较弱的疏水键的作用而进行的,不同的分子与填 料间形成的疏水键不同^[23],通过改变溶液的离子强 度,就可以将不同的分子加以区分。如果藻胆蛋白发 生变性,则其分子内部疏水基团外露,因而引起与 树脂间作用力的增加,导致难于从树脂洗脱。这样, 我们就可以利用此性质将变性的与天然态的分子加 以分离。结果显示,只需一步膨化柱分离操作,就可 以分离得到满足食品及化妆品添加剂纯度要求的藻 胆蛋白。

关于藻红蛋白纯度的评价, 普遍接受的的标准 是 A_{565}/A_{280} 大于 $3.2^{[32]}$, 如果藻红蛋白发生了解离, 565 nm 处的光吸收就会降低从而引起光谱纯度比值 A_{565}/A_{280} 的下降。 $A_{565}/A_{498} \leq 1.5$, $A_{620}/A_{565} \leq 0.005$ 也 被广泛使用。R-藻红蛋白在 498 nm 处有强烈的吸收 值而 B-藻红蛋白则仅有很弱的吸收。如果 $A_{565}/A_{498} \leq 1.5$, 则表明 R-藻红蛋白中没有 B-藻红蛋白污染。 A_{620}/A_{565} 表示 R-藻红蛋白溶液中 C-藻蓝蛋白的含量。本实验 中用离子交换法纯化的 R-藻红蛋白 $A_{565}/A_{498}=1.16$, $A_{620}/A_{565}<0.005$, 达到了试剂级的纯度标准。

3.2 多糖提取

浸提是影响多糖收率、产品质量的主要环节。

水提醇沉法是使用最为广泛的一种多糖提取工艺。 其中,提取温度是与多糖得率密切相关的一个因素, 提高温度、多糖提取率也随之增加、但某些多糖结 构会被破坏、能耗也随之增加。延长提取时间、同样 可以增加多糖得率,但会使多糖水解的比率增多。提 高料液比,在一定程度上可以增加多糖的提取量, 而过多的水分使得后续粗提液浓缩工作变得困难, 大幅度增加能耗的同时降低了多糖的提取效率。提 取液 pH 对条斑紫菜多糖得率有较大影响, pH 值越高, 多糖得率相对则越低。本文设计了这三个因子不同组 合的提取条件, 开展了使用藻胆蛋白提取后的残渣为 原料提取紫菜硫酸多糖最适提取条件的正交筛选实 验,确定了 pH 6,121℃下提取 2 次,每次 1 小时为最 适宜提取条件。相较干完整藻体、残渣为破碎的藻体、 体积小,因而与提取液相对接触面积增大,客观上 加速了对多糖的提取。另一方面,提取藻红蛋白时, 细胞内可溶性蛋白、淀粉或其他一些物质已被移除、 因而、有利于硫酸多糖的提取。

3.3 关于硫酸基的讨论

对于硫酸多糖的提取,条件不能过分强烈,以 免天然结构被破坏或硫酸基团脱落而失去生物活 性。提取硫酸多糖一般不用碱溶液,因为碱性条件下, 多糖中 6-硫酸基组分更容易转变为 3,6-内醚半乳糖, 而导致硫酸基团脱落。吴永沛^[33]使用 0.1 mol/L 盐酸 提取了海带的岩藻聚糖,提取率为 2.1%,产品中 SO₄²⁻含量为 20%。本文使用次等条斑紫菜提取藻红 蛋白后的残渣为原料,多糖得率为 3.05%,其中 SO₄²⁻含量为 21.8%。

3.4 微波与超声辅助提取

传统的长时间高温水提法不仅能耗大,而且易 造成多糖的部分降解及活性的降低,微波和超声波 是近年来逐渐被人们所采用的两种提供能量的形式, 在多糖的提取方面也有不少尝试^[34-35]。微波协同提 取具有比水溶液加热提取植物有效成分效率高,易 控制,提取成本低的特点^[34],王娟等^[36]认为微波能 够激发极性分子使其处于不稳定的状态,不稳定的 极性分子在回归到稳定状态的过程中会迅速释放能 量并传递给其他分子,使得其他分子的热运动增加, 由此增加了单位时间内从物料内部到溶剂的分子数 量,有效地缩短了多糖提取的时间。另一方面,微波 释放的能量使得溶剂的温度升高,水分子汽化产生 的压力在细胞壁和细胞膜表面形成很多易于胞内物 质溶出细胞内部的小孔,降低了多糖提取的能耗^[37]。 但微波功率过大容易加快多糖的水解或引起爆沸。 超声波辅助提取是近年来中药提取分离研究应用较 多的方法,具有提取效率高、提取时间短、能耗低的 特点^[38]。超声波通过破坏细胞膜、细胞壁而增加了 内容物溶出和传输的能力,从而大幅提高了有效成 分的提取率,缩短了提取时间,更重要的是,超声提 取在常温条件下进行,避免了高温对多糖有效成分 的破坏。然而,我们的结果显示,超声辅助并没有有 效增加紫菜多糖的得率,这可能是因为条斑紫菜为 单层细胞,而且已经是充分溶胀的组织材料,传统 的热提法已经足以将其多糖成分快速彻底地溶出。

综上所述,利用次等紫菜同时提取藻红蛋白和 硫酸多糖,使得不宜作为食品加工的藻类资源得到了 综合、高值化的利用,提取的物质可被应用于食品、 药品研发,对促进我国经济的发展也具有重要意义。

参考文献:

- Tang J, Hu Z Y, Chen X W. Free radical scavenging and antioxidant enzymes activation of polysaccharide extract from *Nostoc sphaeroides* [J]. Am J chin Med, 2007, 35: 887-896.
- [2] Drozd N N, Tolstenkov A S, Makarov V A, et al. Pharmacodynamic parameters of anticoagulants based on sulfated polysaccharides from marine algae [J]. Bull Exp Biol Med, 2006, 142: 591-593.
- [3] 孙惠洁, 吴永沛. 海藻硫酸多糖的制备及其抗凝血活 性的研究进展[J]. 食品与药品, 2007, 9(08_A): 54-56.
- [4] Witvrouw M , De Clercq E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs [J]. Gen Pharmacol, 1997, 29: 497-515.
- [5] 周慧萍,陈琼华.紫菜多糖的抗凝血和降血脂作用[J].中国药科大学学报,1990,21(6):358-360.
- [6] Ichihara T, Wanibuchi H, Taniyama T, et al. Inhibition of liver glutathione S-transferase placental form-positive foci development in the rat hepatocarcinogenesis by *Porphyra tenera* (Asakusa-nori)[J]. Cancer Lett, 1999, 141: 211-218.
- [7] Zhang Q, Yu P, Li Z, et al. Antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions from *Porphyra haitanesis*[J]. J Appl Phycol, 2003, 15(4): 305-310.
- [8] Zhang Q, Li N, Liu X, et al. The structure of a sulfated galactan from *Porphyra haitanensis* and its in vivo antioxidant activity[J]. Carbohyd Res, 2004, 339(1): 105-111.
- [9] 张诗山,张虹,牛锡珍,等.南非紫菜多糖抗衰老作 用的研究[J].海洋科学,2013,37(9):68-71.
- [10] Yashizawa Y, Enomoto A, Todoh H, et al. Activation of murine macrophages by polysaccharide fractions from marine alga (*Porphyra yezoensis*)[J]. Biosci Biotech Biochem, 1993. 57: 1862-1866.

- [11] Yashizawa Y, Ametani A, Tsunehiro J, et al. Macrophage stimulation activity of the polysaccharide fraction from a marine alga (*Porphyra yezoensis*): structure-function relationships and improved solubility[J]. Biosci Biotech Biochem, 1995, 59: 1933-1937.
- [12] Khor E, Lim L Y. Implantable applications of chitin and chitosan[J]. Biomaterials, 2003, 24(13): 2339-2349.
- [13] 周裔彬, 汪东风, 杜先锋, 等. 酸化法提取海带多糖 及其纯化的研究[J]. 南京农业大学学报, 2006, 29(3): 103-107.
- [14] Isailovic D, Li H W, Yeung E S. Isolation and characterization of R-phycoerythrin subunits and enzymatic digests[J]. Chromatogr A, 2004, 1051(1): 119-130.
- [15] Huang B, Wang G C, Zeng C K, et al. Experimental research of R-phycoerythrin subunits on cancer treatment: a new photosensitizer in PDT[J]. Cancer Biother Radio, 2002, 17(1): 35-42.
- [16] Li G W, Wang G C, Li Z G, et al. Biological effect of R-phycoerythrin mediated photosensitization on DNA. Prog Biochem Biophys, 2000, 27(6): 621-624.
- [17] Román R B, Alvárez-Pez J M, Fernández F G A, et al. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*[J]. J Biotechnol , 2002, 93(1): 73-85.
- [18] Akhilender K, Sarada R, Manoj G, et al. Toxicity assessment of phycocyanin-A blue colorant from blue green alga *Spirulina platensis*[J]. Food Biotechnol, 1999, 13(1): 51-56.
- [19] Bermejo R, Tobaruela D, Talavera E M, et al. Fluorescent behaviour of B-phycoerythrin in microemulsiones of aerosol OT/water/isooctane[J]. J Colloid Interface Sci, 2003a, 263(4): 616-624.
- [20] Masahiro Y, Keisuke, T, Yumi T, et al. Production of new antioxidant compound from mycosporine-like amino acid porphyra-334 by heat treatment[J]. Food Chem, 2008, 113(4): 1127-1132.
- [21] FAO Fisheries Department. State of world aquaculture 2006[C]//FAO Fisheries Technical Paper. No. 500. Rome: FAO, 2006: 134.
- [22] Kusar T A, Vander M J, Alberte R S. Light-harvesting system of the red alga *Gracilaria tikvahiae* I. Biochemical analysis of pigment mutations[J]. Plant Physiol, 1983, 73(2): 353-360.
- [23] Niu J F, Wang G C, Tseng C K. Method for large-scale isolation and purification of R-phycoerythrin from red alga *Polysiphonia urceolata* Grev[J]. Protein Expres Purif, 2006, 49(1): 23-31.
- [24] NIU J F, CHEN Z F, WANG G C, et al. Purification of

phycoerythrin from *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta) using expanded bed absorption[J]. J Appl Phycol, 2010, 22: 25-31.

- [25] Schägger H , Jagow von G . Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa Anal[J]. Biochem, 1987, 166(2): 368-379.
- [26] 张杰,李春艳,李劲平,等. 蒽酮硫酸法与苯酚硫酸 法测定竹节参多糖含量的比较研究[J]. 中南药学, 2012, 10(6): 421-424.
- [27] Verma B C, Swaminathan K, Sad K C. An improved turbidimetric procedure for determination of sulfate in plants and soils[J]. Talanta, 1977, 24: 49-50.
- [28] Queiroz J A, Tomaz C T. Cabral JMS Hydrophobic interaction chromatography of proteins[J]. J Biotechnol, 2001, 87(2): 143-159.
- [29] Ghosh R, Wang L. Purification of humanized monoclonal antibody by hydrophobic interaction membrane chromatography[J]. J Chromatogr A , 2006, 1107(1): 104-109.
- [30] Jobby M K, Sharma Y. Rapid purification of recombinant β B2-crystallin using hydrophobic interaction chromatography[J]. Protein Expr Purif, 2003, 28: 158-373.
- [31] Chase H A. Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds[J]. Trends Biotechnol, 1994, 12: 296-303.
- [32] Galland-Irmouli AV, Pons L, Luçon M, et al. One-step purification of R-phycoerythrin from the red macroalga Palmaria palmata using preparative polyacrylamide gel electrophoresis[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2000, 739(1): 117-123.
- [33] 吴永沛, 邱晓燕, 张 东, 等. 海带提取岩藻聚糖的 研究[J]. 食品科学, 2003, 24(10): 78-80.
- [34] 边清泉,杨振萍,红车轴草中刺芒柄花素的微波法提 取工艺[J]. 化学研究与应用,2005,17(3):431-432.
- [35] Hromadkova Z, Ebringerova A. Ultrasonic extraction of plant materials-investigation of hemicelluloses release from buckwheat hulls[J]. Ultrason Sonochem, 2003, 10 (3): 127-133.
- [36] 王娟, 沈平穰, 沈永嘉. 微波辅助萃取葛根和刺五加 微观机制的研究[J]. 中草药, 2004, 35(1): 31-33.
- [37] 马长雨,杨悦武. 微波萃取在中药提取和分析中的应 用[J]. 中草药, 2004, 35(11): 7-10.
- [38] 钟玲, 尹蓉莉. 超声提取技术在中药提取中的研究进展[J]. 西南军医, 2007, 9(6): 84-87.

Comprehensive extraction of R-Phycoerythrin and sulfated polysaccharide from *Pyropia yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta)

FENG Jian-hua¹, NIU Jian-feng^{2, 3}, HUANG Ai-you^{2, 3}, WANG Guang-ce^{2, 3}

(1. College of Marine Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; 2. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Nantong Branch, Institute of Oceanology, Chinese, Academy of Sciences, Nantong 226006, China)

Received: Oct., 17, 2014 **Key words:** *Pvropia vezoensis*; R-phycoerythrin; polysaccharide sulfate; expanded bed adsorption; ion-exchange chromatography

Abstract: Inferior *Pyropia yezoensis* was fragmented and then extracted with 10 mmol/L phosphate buffer (pH 6.8) for three times. The supernatant of the extract was applied to an expanded bed adsorption column for collection of the R-phycoerythrin (R-PE) while the residue was used for isolation of sulfated polysaccharide. Approximately 17% of the R-PE presented in the crude extract was recovered by the method of expanded bed adsorption. After purification on a DEAE-Sepharose ion-exchange column, the R-PE was obtained with a purity ratio higher than 3.2, and the purification yield was 0.66 mg/g fresh *P. yezoensis*. Absorption spectroscopy, fluorescence spectroscopy, and electrophoresis showed that the R-PE obtained here had the typical molecular properties reported previously. The yield of sulfated polysaccharide from the residue was 30.5 mg/g, and the sulfate fraction was 21.8% of the crude polysaccharide and microwave-assisted extraction from the residue. The R-PE and sulfated polysaccharide extracted from algae could be used as additive in food or cosmetics. In comparison with the traditional utilization of *P. yezoensis* only as the source of chips, the integrated exploitation method suggested here was more efficient and had additional benefits.

(本文编辑:张培新)