

小珊瑚藻藻红蛋白提取及其稳定性研究

刘广发, 林均民, 林 枫

(厦门大学 生命科学学院 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要:以羟基磷灰石柱层析法从小珊瑚藻(*Corallina pilulifera*)中提取出藻红蛋白,其纯度可达 A_{565}/A_{280} 大于 3,得率为 0.173 g/kg。该藻红蛋白在 498 nm 和 565 nm 处有两处荧光激发峰,为双峰型。荧光发射光谱检测表明藻红蛋白在 pH 5.0~10.0 溶液中具有较高的稳定性,其中以 pH 6.0 和 pH 10.0 的稳定性最高。该藻红蛋白对光照敏感,光照度 800 lx 照射 17 h 后荧光基本消失。对氧化剂 (H_2O_2) 敏感,在 9 以 0.1% 的 H_2O_2 处理 24 h,荧光基本消失。藻红蛋白不耐高温,80 处理 0.5 h,导致蛋白液褪色,荧光消失。

关键词: 小珊瑚藻(*Corallina pilulifera*); 藻红蛋白; 荧光发射光谱; 稳定性

中图分类号: Q94 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096 (2006) 11-0023-05

红藻的光合色素是叶绿素 a 和藻胆蛋白。藻红蛋白 (Phycocyanin, PE) 是藻胆蛋白的重要组成部分之一,位于藻体光能传递链的第一环,属于前级捕光色素,由辅基蛋白和开链四吡咯发色团经硫醚键共价结合而成,可发出橙红色荧光^[1]。提取并深入开展对藻红蛋白的研究对阐明光合作用机理具有重要的意义^[2]。此外,令人感兴趣的是,藻胆蛋白上携带的生色基团使藻胆蛋白呈现出红、蓝、紫等多种颜色,是天然食用色素及潜在的海洋食品和饵料资源^[3]。由于这两方面的原因使得藻胆蛋白成为近年来藻类研究的热点之一。

吕彩真等^[4]认为,温度、pH 值、铜离子、铁离子及光照对红毛菜藻红蛋白粗提液的稳定性有很大影响。作者以小珊瑚藻为研究对象,探讨其藻红蛋白的制备及纯化方法,并对其在光照、高温、不同酸碱度和氧化环境等因素作用下的稳定性进行了初步的探讨,为今后开展藻红蛋白的利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

小珊瑚藻 (*Corallina pilulifera*) 采于厦门鼓浪屿。

1.2 试剂与仪器

参照文献[5]制备羟基磷灰石,荧光扫描在日立

F-4010 型荧光分光光度计上进行。

1.3 方法

1.3.1 藻胆蛋白粗提液制备

样品清洗,吸干表面可见水分,称其质量。加入少量 5 mmol/L K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液(pH7.0,下同),匀浆后置-20 冻结,避光室温解冻,重复 2~3 次。3 000 r/min 离心 15 min,吸取上清,聚乙二醇浓缩提取液^[6]。

1.3.2 藻红蛋白提取

参照文献[7]的方法加以改进。羟基磷灰石湿法装柱,5 mmol/L K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液平衡。样品上柱后,分别以 5, 10 和 20 mmol/L K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液(含 0.2 mol/L NaCl,下同)洗脱不吸附组分、杂蛋白和藻红蛋白;测定样品在 260 nm 与 280 nm 处的吸光度 A 值,计算藻红蛋白的质量浓度与得率。质量浓度(g/L) = $(1.55 \times A_{280} - 0.760 \times A_{260}) \times$ 稀释倍数;以 20 mmol/L K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液将藻红蛋白的溶液稀释 1 倍, $\lambda=590$ nm,扫描 450~600 nm 荧光激发

收稿日期: 2004-10-10; 修回日期: 2005-02-20

作者简介: 刘广发 (1949-), 男, 副教授, 主要从事微型生物分子遗传学和生理生化研究, 电话: 0592-2181001, E-mail: liugf@xmu.edu.cn

光谱。

1.3.3 藻红蛋白稳定性测试

pH 值对藻红蛋白稳定性的影响:分别用 pH3, 4, 5, 6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, pH7, 8 的 K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液, pH9, 10 的 Gly-NaOH 缓冲液将样品稀释 1 倍, 4 恒温 24 h, 扫描 550~600 nm 荧光发射光谱, 绘制荧光强度随 pH 变化的曲线图。

H_2O_2 对藻红蛋白稳定性的影响:用 0.02%、0.1% 的 H_2O_2 溶液将样品稀释 1 倍, 9 恒温 24 h, 进行光谱测定。

光照对藻红蛋白稳定性的影响:将样品置于日光灯下光照度 800 lx 处, 恒温 5 分别照射 4, 8, 12, 15, 17 h, 进行光谱测定。

温度对藻红蛋白稳定性的影响:将样品置于 26, 40 和 60 下恒温 1 h, 80 下恒温 0.5 h, 进行光谱测定。

添加剂对藻红蛋白稳定性的影响:分别以 2 % 的淀粉溶液、40 % 的蔗糖液、95 % 的乙醇和 5 % V_C 溶液将样品稀释 1 倍, 4 恒温 24 h, 进行光谱测定。

2 结果与讨论

2.1 藻红蛋白得率

实验表明, 所得样品纯度指标 A_{565}/A_{280} 大于 3, 符合要求。藻红蛋白质量浓度为 0.20 g/L, 得率为 0.173 g/kg。小珊瑚藻富含石灰质组分, 细胞破碎较完全, 细胞残片离心也较彻底, 得率较高。此外从小珊瑚藻中提取出的藻红蛋白溶液色泽鲜艳清亮, 因而以小珊瑚藻作为色素提取原料有较大的优越性。

2.2 小珊瑚藻的藻红蛋白荧光激发光谱

小珊瑚藻在分类上属真红藻纲的隐丝藻目珊瑚藻科。荧光激发光谱显示其藻红蛋白为 Ⅱ型 R-藻红蛋白, 在 498 nm 和 565 nm 处有荧光激发峰, 在 540 nm 处为一肩峰, 即双峰型(图 1)。有学者认为, Ⅱ型藻红蛋白(在 540 nm 处为一正常荧光激发峰, 即三峰型)在系统进化地位上优于 Ⅰ型 R-藻红蛋白^[8], 因而鉴别藻红蛋白的光谱类型具有一定的分类学意义。温少红等^[9]报道, 紫球藻(*Porphyridium cruentum*)的 B-藻红蛋白在 545 nm 和 563 nm 各有一个峰, 在 498 nm 有一肩峰。同是红藻, 紫球藻和本实验的小珊瑚藻的藻红蛋白荧光激发光谱稍有差别, 或许是由于种间的特异性所决定的。

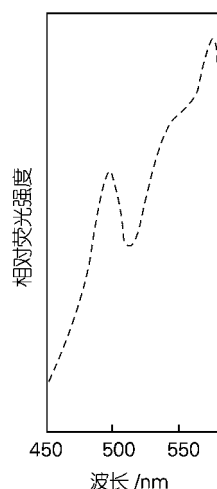


图 1 小珊瑚藻藻红蛋白的荧光激发光谱

Fig.1 The fluorescence emission spectra of phycoerythrin of *Corallina pilulifera*

2.3 pH 值对藻红蛋白的影响

小珊瑚藻藻红蛋白溶液的荧光强度随 pH 值变化的情况比较复杂(图 2~4)。pH 在 6~9 范围内变化时, 荧光强度随 pH 值的升高呈下降趋势, 但强度下降不大; pH 5 时荧光强度介于 pH 6 和 pH 7 之间。pH 4 时荧光强度降至 pH 7 时的 45 % 左右, pH 3 时荧光消失, 而在 pH 10 时荧光强度反而显著升高。有证据表明藻红蛋白可见光吸收光谱能稳定在较大的 pH 范围内 (pH 4~11), 因此荧光强度的变化可能主要由蛋白质结构变化引起。在近中性的环境中, 藻红蛋白分子的整体结构较稳定。pH 6 时蛋白分子存在一个中性的构像, 对于色素基团的荧光发射最为有利。酸性太强 (pH < 4 时) 对蛋白结构有明显的破坏作用, 荧光猝灭; 碱性太强 (pH > 10) 则很可能使蛋白结构出现大幅度翻转, 导致荧光强度陡增。

2.4 H_2O_2 对藻红蛋白的影响

H_2O_2 提供了一个氧化性的环境, 发射光谱清楚地显示随着 H_2O_2 浓度的升高, 藻红蛋白荧光强度剧烈下降(图 5)。当 H_2O_2 体积分数大于 0.1 % 时, 荧光基本消失。 H_2O_2 不仅能作用于分子表面的 Cys, Met, Trp 残基及二硫键, 对藻红蛋白中大量的碳-碳双键也有强烈的破坏作用。观察可见, 随着氧化剂浓度的升高, 蛋白液的红色明显消褪。

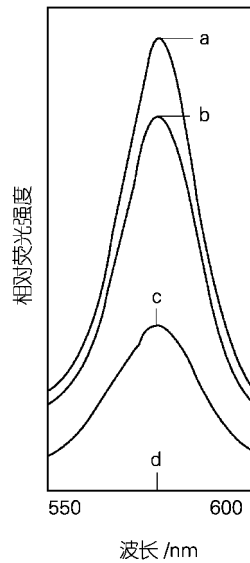


图 2 酸性溶液对藻红蛋白的作用

Fig.2 Effect of acid solution on phycoerythrin
a.pH6 , b.pH5 , c.pH4 , d. pH3

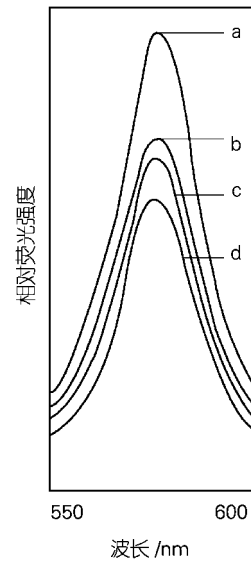


图 3 碱性溶液对藻红蛋白的作用

Fig.3 Effect of basic solution on phycoerythrin
a.pH10 , b. pH7 , c. pH8 , d. pH9

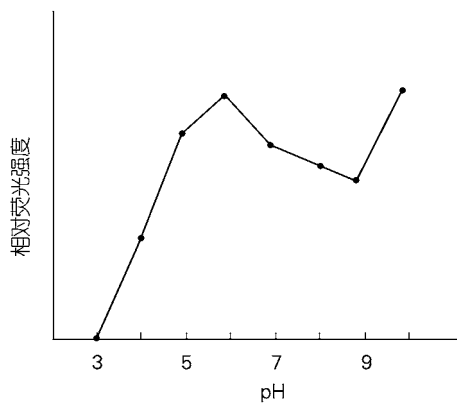


图 4 pH 值对藻红蛋白的作用

Fig.4 Effect of pH on phycoerythrin

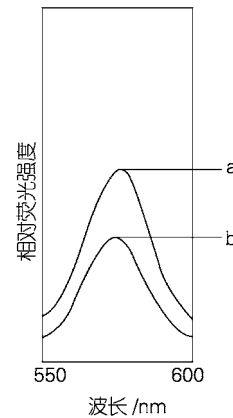


图 5 H_2O_2 对藻红蛋白的影响

Fig.5 Effect of H_2O_2 on phycoerythrin
a.0.01% , b.0.05%

2.5 光照对藻红蛋白的影响

随着样品接受光照时间的延长，藻红蛋白荧光强度趋于下降（图 6）。藻红蛋白是藻类的捕光色素之一，在光合作用中行使捕集光能和传递光能的作用。而这种功能的实现与其结构，特别是构像的变化

密切相关。离体的连续光照必然导致藻红蛋白构像的不可逆变化。此外，光照对色素基团的激发作用使其位于较高的能级，易受环境中各种理化因子的作用而被破坏，这也是荧光强度下降的一个原因。

2.6 温度对藻红蛋白的影响

藻红蛋白在室温中受激发能发出较强的荧光，但荧光强度随着温度的升高而明显下降（图 7）。在温度低于 60 时，荧光强度仍能维持一定水平。温度升高至 80，短时间内蛋白分子变性，色素基团遭破坏，蛋白液褪色，荧光消失，因此图 7 中未能出现 80 处理的曲线。近年 MacColl 等^[10]报道，即使

在南极厚厚的冰层下（2）下采集到的心形银杏藻（*Iridaea cordata*）和 *Phyllophora antarctica*，其藻红蛋白还能正常工作，只不过它在 482 nm 有一个较强的吸收峰，而本实验的 2 种红藻的较强的吸收峰稍稍红移至 498 nm。作者的实验进一步论证了藻红蛋白耐寒不耐热的特性。

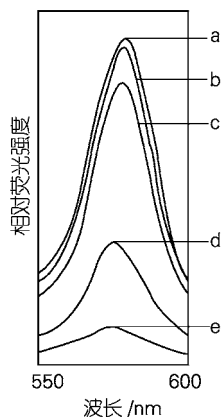


图 6 光照时间对藻红蛋白的影响

Fig.6 Effect of light on phycoerythrin

a.4 h , b.8 h , c.12 h , d.15 h , e.17 h

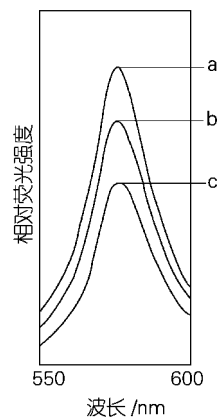


图 7 温度对藻红蛋白的影响

Fig.7 Effect of temperature on phycoerythrin

a. 26 °C , b. 40 °C , c. 60 °C

2.7 添加剂对藻红蛋白的影响

藻红蛋白溶液中分别添加终质量分数为 1 % 的淀粉和 20 % 的蔗糖导致荧光剧增（图 8），蛋白液保持红色和澄清状态，有利于对藻红蛋白溶液的保存，这与螺旋藻藻胆蛋白溶液的特性是一致的^[11]。47.5 % 的乙醇和 2.5 % 的维生素 C 对藻红蛋白有沉淀作用，溶液荧光消失，因此图 8 中未见这两条曲线。所不同的是乙醇沉淀的蛋白仍为红色，而维生素 C 沉淀的则呈紫色。作者曾经尝试了真江篱（*Gracilaria confervoides*）的藻红蛋白的提取，发现提取液也呈紫色，但静置后无沉淀。实验表明，几种藻胆色素的结构只有微细的差异，共轭双键数目的微小变化都会使其吸收波长出现明显的迁移，如藻红胆素甚至能转变为藻蓝胆素。有学者认为紫色的藻红蛋白就是藻红蛋白的变性颜色^[11]。据此，作者推测藻红蛋白在乙醇中的沉淀主要是由于该蛋白在乙醇中的溶解度较低，而某些还原性基团很可能与色素基团发生了强烈的相互作用，使其开环卟啉结构的共轭双键体系受到影

响，导致吸收光波红移的结果。

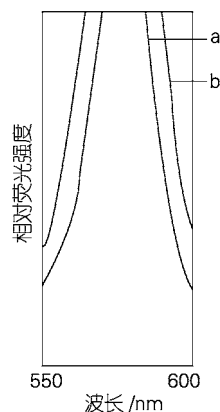


图 8 添加剂对藻红蛋白的影响

Fig.8 Effect of chemical additives on phycoerythrin

a. 淀粉, b. 蔗糖

a. starch, b. sucrose

参考文献：

- [1] 隋正红,张学成.藻红蛋白研究进展[J].海洋科学,1998,4: 24-27.
- [2] 沈同,王镜岩,赵邦梯,等.生物化学[M].北京:高等教育出版社,1991.480-485.
- [3] 孙崇荣,李玉民.蛋白质化学导论[M].上海:复旦大学出版社,1991.31-37.
- [4] 吕彩真,欧光南.红毛菜藻红蛋白的提取及稳定性研究[J].集美大学学报(自然科学版),2002,7(1):15-19.
- [5] 蔡武城.生物化学实验技术教程[M].上海:复旦大学出版社,1983.
- [6] 彭卫民,商树田,刘国琴,等.钝顶螺旋藻藻胆蛋白的提取[J].食品科学,1999,6:48-49.
- [7] 温少红,赵呈龙,张莉萍.紫球藻B-藻红蛋白的分离纯化[J].中国海洋药物,2001,3:33-35.
- [8] 潘忠正,周百成,曾呈奎.pH对两种光谱类型的R-藻红蛋白光的影响[J].海洋与湖沼,1987,18(1):70-75.
- [9] 温少红,徐春野,鞠宝,等.紫球藻藻红蛋白的分离纯化及光谱特性研究[J].海洋通报,2000,19(3):90-94.
- [10] MacColl R, Eisele E L, Malak H, *et al.* Studies on R-phycoerythrins from two Antarctic marine red algae and a mesophilic red alga[J]. *Polar Biology*, 1999, 22(6): 384-388.
- [11] 余久久,李宽钰,吴庆余.螺旋藻的藻胆蛋白提取及稳定性研究[J].海洋通报,1997,16(4):26-28.

Extraction and stability study of phycoerythrins of *Corallina pilulifera*

LIU Guang-fa, LIN Jun-min, LIN Feng

(The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Received: Oct.,10, 2004

Key words: *Corallina pilulifera*; phycoerythrin; fluorescence emission spectra; stability

Abstract: The phycoerythrin of *Corallina pilulifera* has been extracted as the purity more than 3.0 by the ratio of A_{565}/A_{280} by hydroxylapatite column chromatography. 0.173 g phycoerythrin could be obtained from every 1 kg fresh *C. pilulifera*. The phycoerythrin showed two fluorescence emission apexes, ie, 498 nm and 565 nm. So it belongs to the double-apex type of phycoerythrin. Its fluorescence emission spectra showed that the phycoerythrin was high stable in the solution with pH ranged from 5.0~10.0, and that the two high stable points of phycoerythrin appeared at pH 6.0 and pH 10.0 respectively. It was sensitive to light. The fluorescence was generally disappeared after exposing under 800 lx for 17 h. It was also sensitive to oxidants, which make fluorescence disappear after exposing to H_2O_2 (0.1 %) under 9 for 24 h. The color of the phycoerythrin could be faded and its fluorescence lost when it was treated under high temperature 80 for 0.5 h.

(本文编辑:张培新)