

doi: 10.11918/j.issn.0367-6234.2015.06.010

双水相分离纯化 R-藻红蛋白

赵 丽^{1,2}, 彭一良², 付秋爽², 蔡伟民¹

(1. 哈尔滨工业大学 市政环境工程学院, 150090 哈尔滨; 2. 哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院, 150025 哈尔滨)

摘要: 为了获得优于食品级的 R-藻红蛋白(R-PE), 采用双水相体系从坛紫菜中分离纯化 R-PE. 结果表明, 聚乙二醇(PEG)/酒石酸钾钠双水相体系, 当 PEG 相对分子质量为 1 500 且 pH 为 8.06、系线长 22.30%、体积比 0.12 时纯化效果最佳, R-PE 纯度由细胞破碎液的 0.43 提高到 1.47, 回收率为 84.42%. 经过二次双水相纯度达 1.55, 纯化因子为 3.60. 得到的 R-PE 具有较高的生物活性. PEG 相对分子质量 1500/酒石酸钾钠双水相体系成功分离纯化 R-PE, 操作简单, 成本低, 适于工业化.

关键词: R-藻红蛋白; 双水相; 纯度; 酒石酸钾钠

中图分类号: Q51; Q81 **文献标志码:** A **文章编号:** 0367-6234(2015)06-0054-05

Aqueous two-phase processes for separation and purification of R-phycoerythrin

ZHAO Li^{1,2}, PENG Yiliang², FU Qiushuang², CAI Weimin¹

(1 School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, 150090 Harbin, China;

2 College of Life Sciences and Biotechnology, Harbin Normal University, 150025 Harbin, China)

Abstract: The phycoerythrin (R-PE) is a fluorescent protein, which has great commercial and industrial value. In order to obtain a high purity R-PE which above the food grade standard, the R-PE was separated and purified from the *Porphyra haitanensis* using aqueous two-phase system (ATPS). At the optimal conditions of polyethylene glycol (PEG) of 1500 in the ATPS (potassium sodium tartrate/PEG), pH of 8.06, the tie-line length (L_{TL}) of 22.30% and volume ratio (V_r) of 0.12, purity of the isolated R-PE would increase from 0.43 (initial purity) to 1.47 after the first extraction, with a recovery rate of 84.42%. After the second ATPS extraction, achieved a purity and purification factor of 1.55 and 3.60, respectively. The isolated R-PE had a high biological activity. It was a successful purification process for R-PE for industrial application, with the advantages of high efficient and low cost.

Keywords: R-phycoerythrin; aqueous two-phase system; purity; potassium sodium tartrate

R-藻红蛋白(R-phycoerythrin, R-PE)是红藻中的一种水溶性荧光色素蛋白^[1].其主要吸收峰在 490~570 nm^[2],是光合作用中重要的光能天线分子.由于 R-PE 重要的生理功能及其高效的荧光特性,广泛应用于食品、化妆品、医药保健^[3]、荧光分析以及化学光敏剂等领域^[4].尤其在欧、美、日等发达国家,对藻红蛋白的开发十分重视.由于蛋白纯化工艺的步骤繁多、成本高、收率低,每毫克藻红蛋白市场价格达 50~150 美

元^[5-6].坛紫菜属于红藻门,红毛菜亚纲,紫球藻目,紫球藻科紫菜属的一种经济海藻^[7].我国每年坛紫菜的产量约为 35 万 t,约占紫菜总产量的 75%.坛紫菜中富含藻红蛋白,可达干质量的 2.43%^[8].国外常用紫球藻作为提取藻红蛋白的原料^[9-10],国内常用条斑紫菜^[11],极少应用坛紫菜作为提取藻红蛋白的原料.

目前应用基因工程技术生产藻胆蛋白,一般要经过藻胆蛋白的粗提,然后进行多级色谱层析^[12],操作步骤繁多、产量少^[13].近来,一种新型的分离纯化技术——双水相(aqueous two-phase systems, ATPS)分离技术备受关注.双水相萃取具有生物相容性高、条件温和、成本低、易操作等特

收稿日期: 2014-05-25.

作者简介: 赵 丽(1976—),女,副教授,博士研究生;

蔡伟民(1946—),男,教授,博士生导师.

通信作者: 蔡伟民, wwwbll@sina.com.

点,已经在生物化学、细胞生物学、生物化工等学科中物质分离提纯方面得到广泛应用^[14-15]。但由于传统双水相原料聚乙二醇和葡聚糖的成本太高,目前真正工业化的例子还很少。国内外常采用磷酸盐和硫酸盐作为双水相体系的盐相分离提纯藻红蛋白,关于酒石酸钾钠的应用未见报道。本文采用廉价的聚乙二醇/酒石酸钾钠双水相体系,研究高效的 R-PE 分离纯化的可行性。探究双水相分离纯化规律,分析分离萃取过程中,聚乙二醇和盐的相互作用关系,以及各种条件的影响,进而优化整个双水相体系。确定大规模、高效、低成本、易操作的藻红蛋白提取工艺,为藻红蛋白广泛应用提供依据。

1 实验

1.1 实验材料、试剂与仪器

坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*) 由中国海洋大学生命科学学院保种。复苏,培养,离心,称取,弱光干燥,剪切成粉。

聚乙二醇、酒石酸钾钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、磷酸氢钠、硫酸铵均为分析纯,购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 实验方法

1.2.1 藻红蛋白细胞破碎液的制备

准确称取 3 g 干紫菜粉,溶于 60 mL 磷酸缓冲液 (0.01 mol/L, pH7.0), 混合均匀。-20 °C 冷冻,室温融化,反复冻融 5 次。8 000 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

选择聚合物/盐双水相体系。绘制体系相图,根据相图选取多种体系组成。其中的聚合物选择聚乙二醇 (PEG), 储备液质量分数 50%; 盐溶液分别选择酒石酸钾钠、磷酸钠、磷酸钾、硫酸铵, 储备液质量分数 30%。按相图成相要求, 选取不同配比与粗提液混合均匀, 体系总质量 15 g。4 °C 静置, 待上、下相完全分层, 分别记录上、下相体积, 各取 0.2 mL 待测。

1.2.3 双水相系统参数的测定

系线长 (L_{TL}): 双水相系统的上相和下相质量浓度总组成的关系, 通常反映了 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。

分配系数 (K): 目的蛋白在上相和下相质量

浓度的比值。R-PE 极易溶于上相。实验证明其在上相的质量浓度为 0.13 g/L 时, 在下相质量浓度小于 0.2 mg/L。因此下相的回收率可忽略。

纯度 (P): 目的蛋白在 565 nm 处的特征吸光值和总蛋白在 280 nm 处吸光值的比值^[3, 12]。

纯化因子 (F): 目的产物提纯后的纯度与粗提液纯度的比值^[3]。

1.2.4 R-PE 的重复双水相纯化

将上一次 ATPS 获得的上相溶液, 按照一次双水相配比, 将上相 PEG 与同种盐混合均匀, 4 °C 静置, 待上、下相完全分层, 分别记录上、下相体积, 各取少量待测。

1.2.5 分析与鉴定方法

采用紫外-可见分光光度计对上清液从 250 到 700 nm 进行全波长扫描。记录 280, 565, 620, 650 nm 处的吸光值。

藻红蛋白纯度的计算公式为 $P = A_{565} / A_{280}$, 式中: P 为 R-PE 的纯度; A_{565} 为 R-PE 在 565 nm 处的特征吸光值; A_{280} 为总蛋白在 280 nm 处的特征吸光值。

采用荧光发射光谱测定 R-PE 的活性。荧光发射光谱的激发波长为 500 nm, 扫描范围为 520~680 nm。

数据分析运用 ORIGIN 8.5, MATLAB R2008a。

2 结果与分析

2.1 坛紫菜的细胞学形态

光学显微镜 (目镜 10 倍) 下观察坛紫菜的细胞学形态 (见图 1)。

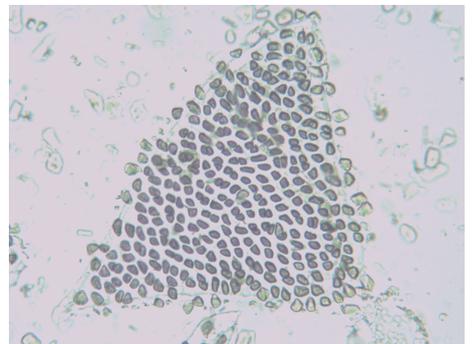


图 1 光镜下坛紫菜的细胞学形态

2.2 不同种类的盐相对 R-PE 纯度的影响

在系线长 ($L_{TL} = (24.5 \pm 1) \%$)、体积比 ($V_r = 1$) 和 PEG 相对分子质量一定的情况下, 比较不同的盐相 (磷酸钾、磷酸钠、酒石酸钾钠和硫酸铵) 对 R-PE 纯度的影响, 结果见图 2。可以看出, PEG 相对分子质量从 1 000~4 000 的各双水相体系中, 酒石酸钾钠构成的双水相体系对 R-PE 提取

效果最好.当 PEG 相对分子质量一定时,酒石酸钾钠体系获得的 R-PE 纯度均高于其他 3 种盐,在 PEG 相对分子质量为 1 500 时,获得最大纯度 0.69.双水相体系中的盐相,因为正负离子的存在对体系中两相有不同的亲和力,使两相之间产生电位差,不同的盐相改变蛋白质的疏水性和相间电位的程度不同.因此,选择最佳的盐相对 R-PE 的提纯非常重要.R-PE 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 分别为 4.8,5.8,6.8,8.06,均超过等电点,这 4 种盐均适合提取 R-PE.体系 pH 可以改变蛋白质所带的电荷,影响蛋白质解离度.实验结果证明,体系 pH 为 8.06 时,提取 R-PE 效果最佳.这与从紫球藻中提取 B-PE 的双水相最佳 pH 8.0^[10] 很接近.也可通过向磷酸盐体系中加入氢氧化钠或氢氧化钾达到 pH 8.0 的目的,但是在常温下,调节后的溶液经常有盐析出.因此,选择酒石酸钾钠作为盐相进行后续试验.

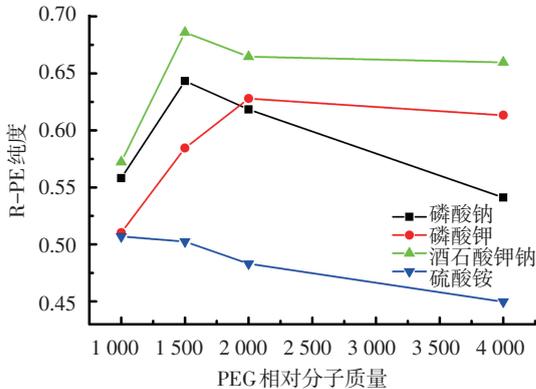


图 2 不同盐相对 R-PE 纯度的影响

2.3 不同 PEG 相对分子质量对 R-PE 纯度的影响

在 PEG (14.26%) 和酒石酸钾钠 (16.86%) 双水相体系中,比较不同的 PEG 相对分子质量 (1 000, 1 500, 2 000, 4 000) 对 R-PE 纯度的影响,结果见图 3.可以看出,相对分子质量 1 500 的 PEG 体系提取效果最好.PEG 分子中含有很多游离的亲水性羟基.在 PEG 相组成一定时,随着相对分子质量的增加,分子链长增加,游离的羟基减少,极性减小,使得富含 PEG 的上相疏水性增加.R-PE 是一种亲水性蛋白,低相对分子质量的 PEG 有利于 R-PE 富集于富含 PEG 的上相.此外,PEG 相对分子质量的增加,使得体系黏度增加,空间阻力增大,界面张力改变,可能引起目的蛋白在界面沉析,从而导致 R-PE 纯度降低.但 PEG 相对分子质量 1 000 并不适合提取 R-PE (相对分子质量为 232 000),可能是因为 R-PE

相对分子质量较大,而对于相对分子质量较小的藻蓝蛋白(相对分子质量为 44 000),PEG 1 000 的提取效果最好^[16].对于 R-PE,PEG 1 500 提取效果最好,基本符合了相对分子质量越低越利于蛋白质富集的规律.

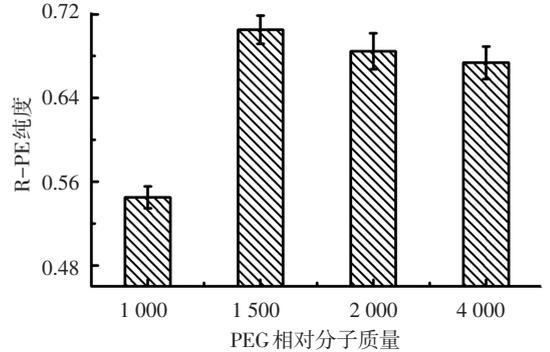


图 3 PEG 相对分子质量对 R-PE 纯度的影响

2.4 L_{TL} 和 V_r 对 R-PE 纯度和回收率的影响

高相对分子质量 (>10 000) 的亲水性蛋白,更容易富集于低相对分子质量的 PEG (<4 000) 和中、短的 L_{TL} (<40%)^[17] 双水相体系.因此,在 PEG 1 500 和酒石酸钾钠双水相体系中,选择 L_{TL} 为 22.30%、26.75%、30.15%、33.42%、35.53% 和同一 L_{TL} 上不同的 V_r (0.12, 0.33, 0.62, 1.0, 1.32, 1.67),比较不同 L_{TL} 和不同 V_r 对 R-PE 纯度的影响,结果见图 4.不同 L_{TL} 和不同 V_r 对 R-PE 回收率的影响见图 5.

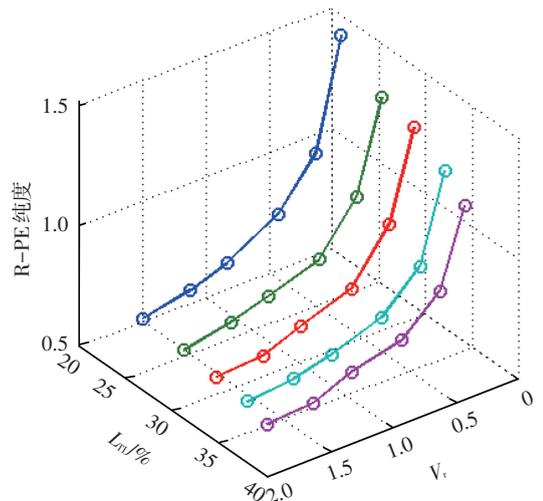


图 4 L_{TL} 和 V_r 对 R-PE 纯度的影响

R-PE 的纯度与 L_{TL} 和 V_r 均呈现负相关.当 L_{TL} 一定时,纯度随着 V_r 的减少呈上升趋势;当 V_r 一定时,纯度随 L_{TL} 的减少呈上升趋势.即 L_{TL} 越短, V_r 越小, R-PE 纯度越高.在 L_{TL} 为 22.30%、 V_r 为 0.12 时, R-PE 的纯度最高达 1.47. L_{TL} 是双水相体系的一个重要因素,反映了系统平衡时上、下相组

成浓度的关系.PEG和盐相的浓度越高, L_{TL} 越长.聚合物PEG对蛋白质有保护作用,但盐浓度过高,使体系离子浓度过强,可能引起蛋白质变性,配基不能发生作用.所以, L_{TL} 越短越有利于R-PE的提取. V_r 变小,上相体积减少,使上相可利用空间减少,导致非目的蛋白更多分配到下相,上相中总蛋白含量减少,纯度提高.

L_{TL} 一定时,R-PE的回收率与 V_r 呈现明显的正相关,随 V_r 的增加,回收率呈上升趋势.在 L_{TL} 为30.15%、 V_r 为1.67处R-PE的最高回收率达98.89%.相同 V_r 时, L_{TL} 对回收率没有显著影响.所有选点的回收率均高于80%.

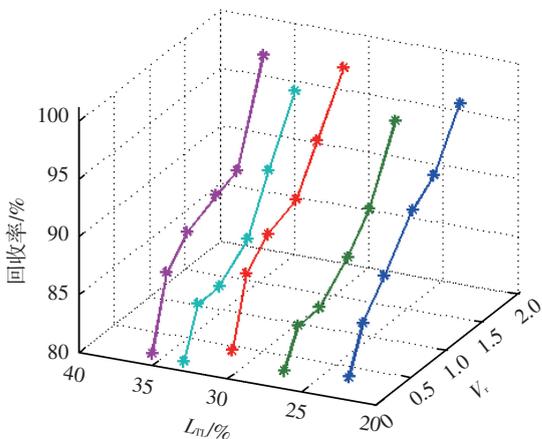


图5 L_{TL} 和 V_r 对R-PE回收率的影响

2.5 相组成质量分数对R-PE纯度的影响

分别在不同 L_{TL} 上选取不同PEG1 500和酒石酸钾钠相组成质量分数配比建立双水相体系,确定最优组成,结果见图6.4.74%的PEG1 500和21%的酒石酸钾钠组成的双水相体系,pH 8.06、系线长22.30%、体积比0.12纯化效果最佳,此时R-PE的纯度由0.43提高到1.47,纯化因子为3.42,回收率为84.42%.

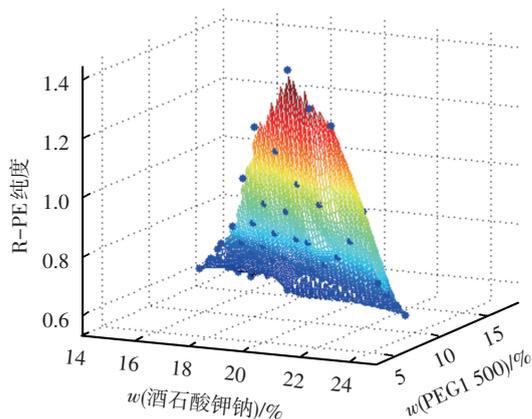


图6 相组成质量分数对R-PE纯度的影响

与双水相体系提取紫球藻中的B-藻红蛋白,采用24.9%的PEG1 450^[3]相比,4.74%的

PEG1 500与其相对分子质量相当,但质量分数减少很多,使整个提取过程更廉价.

2.6 多次ATPS对纯度的影响

选择上述最优配比建立一次双水相体系,取富含R-PE的上相PEG,加入一定量的酒石酸钾钠,建立多次双水相体系,结果见图7.二次ATPS提取的纯化因子最高达3.60,略高于一次ATPS,3次和4次的提纯结果显示纯度没有明显提高,反而下降.多次ATPS可以大幅提高蛋白的纯度^[16],这个规律并不适合R-PE的提取.虽然二次ATPS提取的R-PE的纯度高于一次,但提高幅度很小,并且多次ATPS必然导致回收率的下降^[3].

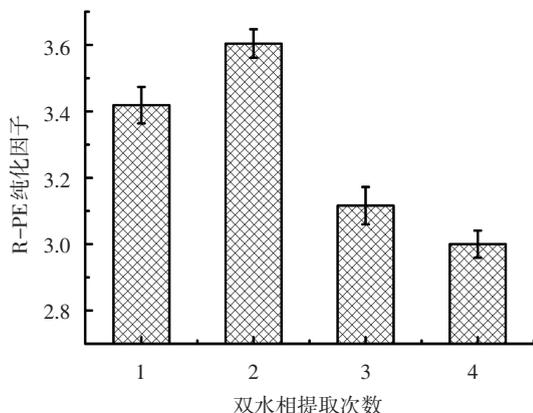


图7 多次ATPS对R-PE纯化因子的影响

2.7 R-PE的生物活性测定

测定二次ATPS提取的R-PE的荧光光谱,结果见图8.在特定波长的激发下,R-PE能发射强烈的荧光^[5].经过双水相萃取提纯的R-PE在572.4 nm处具有荧光发射峰,荧光相对光强为610.7.因此,获得的R-PE生物活性很好.

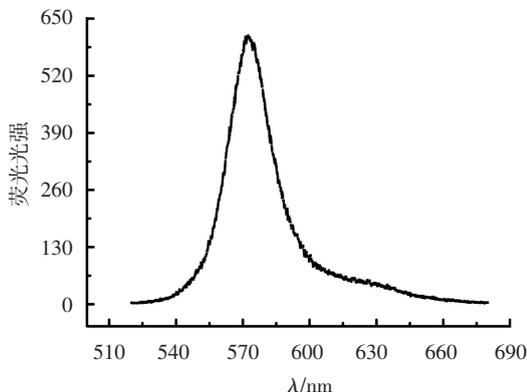


图8 R-PE的荧光发射光谱

3 结语

采用系统的双水相提取方法,从坛紫菜中分离纯化藻红蛋白.结果表明,双水相体系质量分数为4.74%的PEG1 500、21%的酒石酸钾钠、 L_{TL} 为

22.30%、 V_r 为 0.12、pH 为 8.06 时,蛋白的纯度为 1.47,回收率为 84.42%。经过二次双水相藻红蛋白纯度可达 1.55,纯化因子为 3.60。经测定获得的蛋白具有较高的生物活性。如果提高细胞破碎液纯度,可得到更高纯度的 R-PE。

参考文献

- [1] 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.
- [2] RANJITHA K, KAUSHIK B D. Purification of phycobiliproteins from *Nostoc nuscorum* [J]. *Sci Ind Res*, 2005, 64 (5): 372-375.
- [3] BENAVIDES J, RITO-PALOMARES M. Potential aqueous two-phase processes for the primary recovery of colored protein from microbial origin [J]. *Eng Life Sci*, 2005, 5 (3): 259-266.
- [4] BHAT V B, MADYASHTA 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 (2): 262-266.
- [5] RICHARD P. Handbook of fluorescent probes and research chemicals [M]. Eugene: Molecular Probes, 1992.
- [6] CORPORATION M. <http://www.marketbio.com>, 1999.
- [7] 蔡春尔,吴庆磊,何培民.条斑紫菜 R-藻红蛋白提纯工艺研究[J].*生物技术通讯*, 2005, 16(5): 518-521.
- [8] DUFOSSEA L, GALAUPA P, YARONB A, et al. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: scientific oddity or an industrial reality [J].*Trends in Food Sci Technol*, 2005, 16 (9): 389-406.
- [9] HEMÁNDEZ-MIRELES T, RITO-PALOMARES M. Improved recovery of B-phycoerythrin produced by the red microalga *Porphyridium cruentum* [J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 2006, 81: 989-996.
- [10] BENAVIDES J, RITO-PALOMARES M. Bioprocess intensification: a potential aqueous two-phase process for the primary recovery of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum* [J]. *J Chromatog B*, 2004, 807 (1): 33-38.
- [11] 岳岑,冯维希,黄文,等.双水相萃取法提取条斑紫菜 R-藻红蛋白工艺 [J]. *食品科学*, 2011, 6(16): 41-44.
- [12] PATIL G, CHETHANA S, SRIDEVI A S, et al. Method to obtain C-phycoerythrin of high purity [J]. *Chromatogr A*, 2006, 1127(1/2): 76-81.
- [13] BERMEJO R R, ALVÁREZ-PEZ J M, ACIÉN F F G, et al. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* [J]. *J Biotechnol*, 2002, 93(1): 73-85.
- [14] 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.
- [15] GARZA-MADRID M, RITO-PALOMARES M, SEMA S 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.
- [16] ZHAO Li, PENG Yiliang, GAO Jiamei, et al. Bioprocess intensification: an aqueous two-phase process for the purification of C-phycoerythrin from dry *Spirulina platensis* [J]. *Eur Food Res Technol*, 2014, 238 (3): 451-457.
- [17] CABEZAS H. Theory of phase formation in aqueous two phase systems [J]. *Chromatogr B*, 1996, 680: 3-30.

(编辑 刘彤)