



反胶团萃取分离螺旋藻藻蓝蛋白

刘 杨, 王雪青, 庞广昌

(天津商业大学, 天津市食品生物技术重点实验室, 天津 300134)

摘要: 研究了 CTAB/正戊醇-正辛烷反胶团溶液萃取分离螺旋藻藻蓝蛋白的性能. 考察了水相离子强度和种类, 有机相中表面活性剂浓度和助溶剂浓度等因素对萃取行为的影响, 并从反胶团的微观结构予以解释. 结果表明: 0.04 mol/L CTAB/正戊醇-正辛烷 (体积比 1:4) 的反胶团体系用于萃取 pH7.0, 包含 0.1 mol/L KCl 的螺旋藻细胞破碎液, 藻蓝蛋白萃取率可达 96.3%, 分配系数达到 26.0; 采用 pH5.0, 包含 2 mol/L KBr 的反萃液反萃藻蓝蛋白, 反萃取率可达 90.6%.

关键词: 螺旋藻; 藻蓝蛋白; 反胶团; 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB); 萃取

中图分类号: TS20 文献标识码: A 文章编号: 1672-6510 (2008) 02-0030-04

Liquid-Liquid Extraction of c-Phycocyanin from *Spirulina* Using Reversed Micelles

LIU Yang, WANG Xue-qing, PANG Guang-chang

(Tianjin University of Commerce, Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, Tianjin 300134, China)

Abstract: The supernatant extraction of c-phycocyanin by reversed micelles using surfactant CTAB was carried out. Various parameters of the aqueous phase (pH, the type and concentration of salt), as well as the organic phase (concentration of surfactant and co-solvent) were studied. The experimental data can be interpreted reasonably by the microscopic structure of the micellar organic phase. It is reported that from the supernatant of pH7.0, 0.1 mol/L KCl disrupted *Spirulina* cell, the partition coefficient of c-phycocyanin is as high as 26.0 with a yield of 96.3% extracted by 0.04 mol/L CTAB/n-pentanol-octane (1:4v/v) reversed micelles. A back extraction yield of c-phycocyanin is 90.6% by pH5.0, 2 mol/L KBr solution as back extractant.

Keywords: *Spirulina*; c-phycocyanin; reversed micelles; cetyl trimethylamine bromide; solvent extraction

螺旋藻 (*Spirulina*) 是蓝藻门、藻蓝纲、段殖体目、颤藻科中的一个属, 是一种丝状多细胞螺旋形原核藻类生物, 包括钝顶螺旋藻、极大螺旋藻、盐泽螺旋藻等多种品系. 螺旋藻中含有丰富的藻胆蛋白, 藻胆蛋白中又包含藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白以及藻红蛋白等多种蛋白质, 其中藻蓝蛋白作为一种有多种生理活性的天然蛋白质具有良好的药用开发前景^[1-3], 并且它在螺旋藻中的含量较高, 因此, 螺旋藻藻蓝蛋白的分离纯化方法成为螺旋藻类蛋白研究的热点. 传统的

分离纯化方法多采用盐析沉淀法^[4,5], 该方法包括沉淀、离心和透析这三个主要操作环节, 在实际工业化生产过程中存在操作步骤烦琐, 动力能耗高以及操作周期长等缺点.

反胶团萃取具有传统液液萃取的优点: 操作条件温和、流程设备简单、易于规模化放大; 而且反胶团内的“微水池”环境接近细胞内的环境, 蛋白质不易变性, 适于蛋白质等生物大分子的分离、浓缩和纯化, 对细胞发酵液中的胞外产物^[6]和细胞破碎液中的

收稿日期: 2007-11-06; 修回日期: 2008-01-07

基金项目: 天津市重大科技攻关项目 (06YFGZNC04200); 天津市自然科学基金重点项目 (08JCZDJ16600)

作者简介: 刘 杨 (1978—), 女, 河北秦皇岛人, 讲师, 博士; 通讯作者: 王雪青, 教授, wxqing@tjcu.edu.cn

胞内产物^[7]均有良好的萃取分离效果。

本文探讨一种简单有效的适合大量萃取分离螺旋藻藻蓝蛋白的方法——反胶团萃取,对该方法萃取藻蓝蛋白的萃取条件进行优化,并从反胶团的微观结构解释各种因素对藻蓝蛋白萃取和反萃取的影响。由于钝顶螺旋藻藻蓝蛋白的等电点为 pH4.3^[8],在 pH 为中性的螺旋藻细胞破碎液中藻蓝蛋白带负电荷,因此,本研究选取 CTAB 阳离子表面活性剂形成的反胶团体系,研究藻蓝蛋白在其中的萃取分配行为。

1 材料与方法

1.1 材料

钝顶螺旋藻粉产自内蒙古鄂托克旗乌兰镇;十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、正辛烷、正戊醇和其他无机盐均为国产分析纯试剂。

1.2 分析方法

螺旋藻中以藻胆蛋白吸收光谱的差异作为其检验的标准。藻红蛋白(PE)最大光吸收在 490~500 nm,藻红蓝蛋白(PEC)在 568 nm,藻蓝蛋白(PC)在 620 nm 附近,别藻蓝蛋白(APC)在 650 nm。因此,藻胆蛋白中各组成蛋白含量可根据 Kaplan, D 等^[9]采用的方法进行测定。

$$[\text{PC}] = \frac{A_{620} - 0.474A_{650}}{5.34} \quad (1)$$

$$[\text{APC}] = \frac{A_{650} - 0.208A_{620}}{5.09} \quad (2)$$

$$[\text{PE}] = \frac{A_{568} - 2.41([\text{PC}] + [\text{APC}]) - 0.849[\text{APC}]}{9.62} \quad (3)$$

式 1—式 3 中:[PC]、[APC]、[PE]分别代表藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白和藻红蛋白的质量浓度(mg/mL); A_{620} 、 A_{650} 、 A_{568} 分别代表波长在 620 nm、650 nm 和 568 nm 处的吸光度。

1.3 反胶团萃取

1.3.1 螺旋藻细胞破碎

准确称取 0.5 g 螺旋藻粉,加入 100 mL 的 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液(pH=7.0),采用反复冻融(3次)的方法对藻体细胞进行破碎,在显微镜下观察计数细胞破碎率可达到 90%以上。将破碎的螺旋藻细胞悬浊液于 4 000 r/min 离心 20 min,倾倒入上清液可得到含藻胆蛋白的粗提液。测粗提液在 620 nm 和 650 nm 下的吸光度,计算藻蓝蛋白的含量。

1.3.2 反胶团溶液配制

将 CTAB 以一定比例溶于正辛烷和正戊醇(体

积比为 4:1)的混合液中,并用 pH=7.0, 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液洗涤 2—3 次,得到透明澄清的 CTAB 反胶团溶液。

1.3.3 反胶团的萃取与反萃取

在 10 mL 带塞的离心试管中加入等体积的藻胆蛋白粗提液和反胶团溶液(均为 4 mL),在恒温 25 °C 以 60 次/min 的频率上下颠倒离心管 10 min,使两相充分混合,藻蓝蛋白质达到分配平衡。然后静置分层,将油水两相分离,水相为反胶团萃取液。用移液管抽取下相(水相)溶液,在 568 nm、620 nm 和 650 nm 下测吸光度,计算藻蓝蛋白的含量。向装有油相(抽取完反胶团萃取液的剩余部分)的离心管中加入等体积不同 pH(0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液)的无机盐溶液(均为 4 mL),在恒温 25 °C,以 60 次/min 的频率上下颠倒离心管 120 min,使两相充分混合,藻蓝蛋白质达到分配平衡。然后静置分层,将油水两相分离,水相为反胶团反萃取液。用移液管抽取下相(水相)溶液,在 568 nm、620 nm 和 650 nm 下测吸光度,计算藻蓝蛋白的含量。

1.3.4 藻蓝蛋白萃取率、分配系数和分离因数

在反胶团体系萃取过的螺旋藻细胞破碎液(粗提液)中,藻蓝蛋白富集于反胶团体系的上相(即反胶团溶液有机相),因此,计算藻蓝蛋白萃取率(E)、藻蓝蛋白反萃取率(E')、分配系数(K)和分离因数(β)如式 4—式 7:

$$E = \frac{[\text{PC}]_t \times V_t}{[\text{PC}]_0 \times V_0} \times 100\% \quad (4)$$

$$E' = \frac{[\text{PC}]_b \times V_b}{[\text{PC}]_0 \times V_0 \times E} \times 100\% \quad (5)$$

$$K = \frac{[\text{PC}]_t}{[\text{PC}]_b} \quad (6)$$

$$\beta = \frac{[\text{PC}]_t / [\text{PC}]_b}{[\text{APC}]_t / [\text{APC}]_b + [\text{PE}]_t / [\text{PE}]_b} \quad (7)$$

式 4—式 7 中的 V 代表溶液体积,下标 0、t、b 分别代表粗提液、萃取或反萃取后反胶团体系上相(有机溶剂相)和下相(水相)的溶液。

2 结果与讨论

2.1 盐离子种类和浓度对萃取的影响

盐离子种类和浓度主要影响蛋白质与表面活性剂极性头之间的静电作用力。表 1 中显示出几种盐对反胶团萃取螺旋藻藻蓝蛋白的影响。由表 1 可见,改

变阴离子种类 (Cl^- 、 SO_4^{2-} 、 PO_4^{3-})对萃取的影响大于改变阳离子种类 (K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+})对萃取的影响. 这是由于本实验采用的阳离子表面活性剂CTAB, 因此该表面活性剂分子的头部受到阴离子的静电屏蔽作用较大, 并且随着离子价态的增加, 即离子强度的增加, 这种静电屏蔽作用越大, 如表1中所示, 在相同的

盐浓度下, K_3PO_4 作用下的藻蓝蛋白萃取率比 KCl 作用下的萃取率降低了15.7%, 同时分配系数降低了527%, 分离因数降低了104%; 而对于不同的阳离子种类的影响却没有这么显著, 对于 K_2SO_4 、 Na_2SO_4 和 MgSO_4 作用下的藻蓝蛋白的萃取率和分离因数的变化均未超过2%, 分配系数变化未超过20%.

表1 盐离子种类对反胶团萃取藻蓝蛋白的影响

Tab. 1 Effect of salt type on reversed micelles extraction of c-phycoyanin

盐离子种类	萃取现象	$E/\%$	K	β
KCl	分相快, 油水界面清晰	96.3	26.0	1.53
K_2SO_4	分相比较快, 油水界面模糊	90.5	9.53	1.11
K_3PO_4	分相慢, 出现中间乳化层	80.6	4.15	0.75
Na_2SO_4	分相比较快, 油水界面模糊	91.1	10.2	1.13
MgSO_4	分相比较快, 油水界面模糊	89.6	8.62	1.11

注: 0.04 mol/L 的 CTAB/正戊醇-正辛烷 (体积比 1 : 1) 反胶团体系萃取, pH=7, 包含 0.1 mol/L 不同盐种类的螺旋藻细胞破碎液.

图1显示了不同种类的盐浓度对藻蓝蛋白萃取率的影响. 由图可见, 在不同的盐浓度下, KCl 、 K_2SO_4 和 K_3PO_4 对藻蓝蛋白的影响与表1中的结果相吻合; 同时, 随着盐浓度的增加, 藻蓝蛋白的萃取率逐渐下降, 这进一步说明离子强度对反胶团萃取蛋白质的影响, 离子强度增加可削弱蛋白质与表面活性剂极性头之间的静电作用力, 导致蛋白质萃取率的下降.

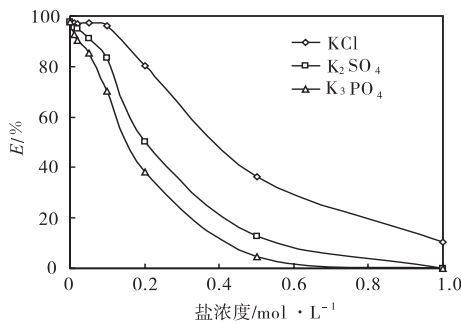


图1 盐离子种类和浓度对萃取率的影响

Fig. 1 Effect of salt type and salt concentration on extraction

2.2 表面活性剂浓度对萃取的影响

表面活性剂浓度是影响反胶团形成以及反胶团大小的重要因素^[10]. 在表面活性剂溶液中, 表面活性剂的浓度只有超过其临界胶团浓度时, 溶液中才能自发的形成反胶团. 根据胶团形成的质量作用定律, 增加表面活性剂的浓度将使有机相中胶团聚集的数目及胶团粒径增加, 导致反胶团相的萃取容量随表面活性剂浓度的增大而提高. 表2中显示的实验结果与上述理论相吻合.

从表2可以看出: 随着CTAB浓度由0.02 mol/L增加到0.06 mol/L, 藻蓝蛋白的萃取率由85.4%增加到96.5%, 分配系数由5.85增加到27.6, 但由于藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白和藻红蛋白在分子质量和等电点等性质上的差别并不显著^[10], 因此, 藻蓝蛋白的分离因数 β 增加并不显著. 另一方面, 当CTAB浓度增加到一定程度(高于0.05 mol/L)时, 有机相黏度增大的程度影响了油水两相的分层速度, 因此, 本实验研究确定表面活性剂CTAB浓度为0.04 mol/L.

表2 表面活性剂浓度对反胶团萃取藻蓝蛋白的影响

Tab. 2 Effect of surfactant concentration on reversed micelles extraction of c-phycoyanin

CTAB 浓度/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	萃取现象	$E/\%$	K	β
0.02	分相快, 油水界面模糊	85.4	5.85	1.47
0.03	分相快, 油水界面较模糊	92.3	12.0	1.31
0.04	分相快, 油水界面清晰	96.3	26.0	1.53
0.05	分相比较慢, 油水界面清晰	96.7	29.3	1.58
0.06	分相慢, 油水界面清晰	96.5	27.6	1.49

注: 不同浓度的CTAB/正戊醇-正辛烷 (体积比 1 : 4) 反胶团体系萃取, pH=7, 包含 0.1 mol/L KCl 螺旋藻细胞破碎液.

2.3 水相 pH 对萃取的影响

离子型反胶团体系萃取蛋白质主要依靠蛋白质与表面活性剂极性头之间的静电作用力. 而蛋白质是一种两性电解质, 水相的 pH 决定了蛋白质分子表面

可电离基团的离子化程度, 只有当蛋白质带的电荷与反胶团内带的电荷性质相反时, 才能发生萃取. 本实验选取了 pH5 ~ 8 考察水相 pH 对藻蓝蛋白萃取的影响, 如表3所示. 结果显示: 随着水相 pH 的增加, 藻

蓝蛋白的萃取率、分配系数和分离因数均有不同程度的增加,表明随着 pH 的增加,藻蓝蛋白偏离其等电点 (pH4.3) 越大,所带的负电荷越多,导致其萃取

率增加.但当水相 pH 为 8 时,萃取过程中油水界面处出现了沉淀层,说明藻蓝蛋白此时发生了变性,因此,本实验研究选定水相 pH 为 7.

表 3 水相 pH 对反胶团萃取藻蓝蛋白的影响

Tab. 3 Effect of pH on reversed micelles extraction of c-phycoyanin

pH	萃取现象	E/%	K	β
5	分相快,油水界面清晰	15.6	0.18	0.92
6	分相快,油水界面清晰	56.3	1.29	0.89
7	分相快,油水界面清晰	96.3	26.0	1.53
8	分相慢,出现中间沉淀层	95.3	20.3	2.23

注: 0.04 mol/L 的 CTAB/正戊醇-正辛烷 (体积比 1:4) 反胶团体系萃取,包含 0.1 mol/L 的 KCl 螺旋藻细胞破碎液.

2.4 助剂浓度对萃取的影响

反胶团形成的理论研究^[10]表明:低级醇作为助溶剂添加到反胶团体系中,一方面可以提高表面活性剂在有机相中的溶解度;另一方面还参与了反胶团的形成,增大反胶团的含水量及粒径大小.本实验选取了正戊醇作为助剂,同时考察其对 CTAB 反胶团体系萃取藻蓝蛋白的影响.

如表 4 所示,随着正戊醇浓度的增加,藻蓝蛋白的萃取率、分配系数和分离因数均有所增加,并且萃

取过程中油水两相的分相速度也随之增大,这与上述的理论相一致.但当正戊醇浓度增大到一定程度 (正戊醇与正辛烷的体积比为 1:3) 时,藻蓝蛋白的萃取率、分配系数和分离因数均急剧下降,这是由于助剂正戊醇浓度过大,反胶团表面上正戊醇分子所占的比例过大,导致反胶团内部表面活性剂 CTAB 分子头部之间的静电斥力下降,从而使反胶团表面的 CTAB 分子相互靠得更紧,致使反胶团变小,萃取容量下降.

表 4 正戊醇浓度对反胶团萃取藻蓝蛋白的影响

Tab. 4 Effect of n-pentanol concentration on reversed micelles extraction of c-phycoyanin

V(正戊醇):V(正辛烷)	萃取现象	E/%	K	β
1:3	分相快,油水界面清晰	23.6	0.31	0.66
1:4	分相快,油水界面清晰	96.3	26.0	1.53
1:5	分相比较快,油水界面清晰	94.2	16.2	1.65
1:8	分相比较慢,油水界面清晰	88.1	7.40	0.99
1:10	分相慢,出现中间沉淀层	55.4	1.24	0.68

注: 0.04 mol/L 的 CTAB/正戊醇-正辛烷 (不同体积比) 反胶团体系萃取,pH=7,包含 0.1 mol/L 的 KCl 螺旋藻细胞破碎液.

2.5 藻蓝蛋白的反萃取

藻蓝蛋白的萃取率随水相 pH、盐离子种类和浓度的变化规律见表 5.

表 5 水相 pH 和盐离子种类及浓度对藻蓝蛋白反萃取的影响

Tab. 5 Effect of pH, salt type and salt concentration on back extraction of c-phycoyanin

盐离子种类	浓度/ mol · L ⁻¹	E/%			
		pH4	pH5	pH6	pH7
KCl	1	3.4	23.7	15.6	5.8
	2	7.9	56.7	34.2	12.9
KBr	1	11.8	84.7	51.7	23.6
	2	15.2	90.6	54.3	26.0

注: 0.04 mol/L 的 CTAB/正戊醇-正辛烷 (体积比 1:4) 反胶团体系萃取,包含 0.1mol/L 的 KCl 螺旋藻细胞破碎液,藻蓝蛋白萃取率为 96.3%.

从表 5 可以看出,静电相互作用力主导了藻蓝蛋白在 CTAB 反胶团中的萃取过程.因此,从理论上分

析,通过削弱藻蓝蛋白分子与 CTAB 分子之间的静电相互作用力可实现藻蓝蛋白从 CTAB 反胶团中的反萃取过程,所以,本实验在藻蓝蛋白的反萃取过程采取降低水相 pH 和增加水相盐浓度的方法.在不同的盐离子种类和浓度的条件下,藻蓝蛋白的反萃取率整体上随水相 pH 的降低而增加,说明藻蓝蛋白分子所带负电荷随水相 pH 的降低而减少,导致与 CTAB 分子的静电相互作用减弱,从而实现反萃取率的增加,但当水相 pH 为 4 时,反萃取过程中油水界面处出现了沉淀层,说明藻蓝蛋白此时发生了变性,导致藻蓝蛋白的反萃取率较低,并不符合上述反萃取率随水相 pH 的变化规律;在相同 pH 和盐离子种类条件下,藻蓝蛋白的反萃取率随水相离子强度的增加而增加,说明水相离子强度的增加可增大 CTAB 分子反离子的数目,使 CTAB 分子的静电屏蔽作用增加,导致与藻蓝蛋白分子的静电相互作用减弱,使藻蓝蛋

(下转第 64 页)