

巢湖蓝藻水华藻胆蛋白的分离与鉴定

瞿文川

余源盛

苏晨伟

(中国科学院南京地理与湖泊研究所, 南京 210008)

(南京大学制药厂, 南京 210009)

摘要 在高湿季节, 巢湖等国内淡水湖中蓝藻大量繁殖常形成蓝藻湖靛(主要由微囊藻组成), 它含有丰富的蛋白质、氨基酸、脂肪等营养成分。本文对微囊藻中氨基酸的组成及含量进行了测试, 并从其中提取、分离纯化了藻胆蛋白(指其中的藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白), 最后运用紫外可见光谱对其进行了检测, 取得了较为满意的结果。这也为进一步开发利用巢湖湖靛提供了依据。

关键词 巢湖 蓝藻湖靛 藻胆蛋白 氨基酸 微囊藻

近年来从微藻中提取植物蛋白、氨基酸和天然色素等已成为生物学、食品工程学、生命保健学等学科研究和开发的一个热点。由于蓝藻中含有植物蛋白、维生素、氨基酸等丰富营养成分, 墨西哥、日本等国及中国台湾的一些科研机构和生产厂家, 已开始大量培养螺旋藻(*Spirulina*, 蓝藻的一种), 将其作为添加剂制成高营养的藻片等保健食品、饮料和药品等。而从蓝藻中提取的天然色素对人体无任何副作用, 正逐步取代化学合成色素。

国内淡水湖如巢湖中的蓝藻主要是微囊藻(*Microcystis*)所组成的水华, 俗称湖靛^[1]。巢湖中蓝藻产量大, 且蛋白质含量高, 很有希望作为人类蛋白的直接或间接来源^[2]。本文介绍了从中提取、分离纯化藻胆蛋白的方法; 对微囊藻中生理氨基酸的组成及含量进行了测试, 结果令人满意, 可望为深入开发利用及研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

1.1.1 仪器 (1) UV-240 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司); (2) MD-2K-1 型电光分析天平(上海天平厂); (3) GL-20 型高速离心机(日本精工有限公司); (4) BSZ-160 型部分收集器(上海沪西仪器厂)等。

1.1.2 试剂 (1)磷酸二氢钾(分析纯); (2)磷酸氢二钾(分析纯); (3)石英砂; (4)硫酸铵(分析纯); (5)液氮等。

1.2 方法

1.2.1 样品的采集及处理 在水体污染较小的巢湖水域, 捞取湖靛, 经清洗之后, 用纱布压

• 中国科学院南京分院择优支持基金与中国科学院南京地理与湖泊研究所所长基金资助项目。

收稿日期: 1994 年 6 月 13 日; 接受日期: 1994 年 8 月 9 日。

作者简介: 瞿文川, 男, 1966 年生, 助理研究员。1992 年南京大学化学系分析化学专业研究生毕业。主要从事湖泊沉积学及地球化学研究。已发表“网状玻璃碳光谱电化学池的制作及其应用”等论文数篇。

榨去掉水份,并将其制成干粉待用。

1.2.2 藻胆蛋白粗提物的制备 取一研钵,加入湖靛干粉 2g 和 0.001mol/L (pH7.0)的磷酸盐缓冲溶液(PBS)20mL,同时加入少量石英砂,用玻璃棒搅匀后,用液氮反复冻融细胞三次,并快速研磨。将研磨好的液体在 4℃离心 15min (20000 转/min)后,收集上清液,约 26mL。

1.2.3 盐析 在上述上清液中慢慢加入 9.39g 固体硫酸铵达 60%饱和度,一边加入一边用玻璃棒慢慢搅动;静置 1h,此时出现淡蓝色絮状沉淀。离心 5min (5000 转/min)后,弃去上清液,并将沉淀溶于 0.001mol/L (pH7.0)的 PBS 缓冲溶液中。

1.2.4 透析 将上述蛋白质溶液加入透析袋中,于 0.001mol/L (pH7.0)PBS 缓冲溶液中透析 24h,每隔 5h 更换一次缓冲溶液。由于透析袋为半透膜,只允许小分子物质透过,如无机盐、藻毒素等。而蛋白质大分子则仍保留在透析袋中,达到了提纯、去毒的效果。

1.2.5 藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白的分离 藻胆蛋白可分成藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白和藻红蛋白 3 个主要大类,用吸附柱层析法对藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白进行分离。主要步骤如下:

(1) 装柱 将一根 1×15cm 的层析柱垂直固定于铁架台上,用恒流泵从层析柱下端注入 0.001mol/L 的 PBS 溶液至 1cm 高,再将搅匀的羟基磷灰石溶液沿玻璃棒慢慢装满层析柱,待羟基磷灰石沉积后,量柱高为 8cm。

(2) 平衡 旋紧层析柱上端螺帽,接上恒流泵,用 2 倍体积的 0.001mol/L 的 PBS 溶液以 1mL/min 的流速平衡 1.5h。

(3) 上样 关闭恒流泵,打开层析柱上端螺帽,用吸管加入 3mL 粗藻胆蛋白,并用少量的 0.001mol/L 的 PBS 溶液冲洗柱壁 2~3 次。

(4) 洗脱 用 0.001mol/L 的 PBS 溶液(A)和 0.1mol/L 的 PBS 溶液(B)进行梯度洗脱。开始用 100%A 液,逐步增大离子强度,直至 B 溶液达 100%。

(5) 收集 用自动分部收集仪每 10min 收集一试管洗脱液。

1.2.6 氨基酸分析 样品按常规处理。用氨基酸分析仪测定。

1.2.7 光谱分析 吸收光谱用岛津 UV-240 型紫外可见光光度计测定。

2 结果和讨论

巢湖蓝藻的藻体经反复冻融,上清液经固体硫酸铵沉淀(60%(W/V)饱和度),所得粗藻胆蛋白经 HA 柱层析,磷酸盐缓冲溶液洗脱,可得到藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白的洗脱峰。洗脱顺序为藻蓝蛋白在前,别藻蓝蛋白在后。从而也可达到纯化藻胆蛋白粗提物的目的。

取粗的藻胆蛋白和纯化的藻胆蛋白经过适当稀释后,放入石英比色皿中,在 200~700nm 波长范围内测其吸收光谱(图 1)。可以看到曲线 1 在波长 609nm 和 280nm 处有两个吸收峰;曲线 2 在波长 651nm 和 271nm 处有两个吸收峰。由于藻蓝素的特征吸收峰在 615nm 左右,别藻蓝素的特征吸收峰约在 652nm 处^[3]。而图上 270nm 左右的吸收峰是蛋白质的吸收峰,系由酪氨酸和色氨酸所引起^[4]。从而可以判断:曲线 1 为藻蓝蛋白的特征吸收光谱曲线;曲线 2 为别藻蓝蛋白的特征吸收光谱曲线。同时也表明从湖靛中提取出藻胆蛋白,并分离出藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白。

接着对微囊藻中生理氨基酸的组成与含量进行了进一步测试(表 1),结果表明微囊藻含有丰富的生理氨基酸,其所含的氨基酸占其干重的 59.38%。其中人体必需的 8 种氨基酸,含量占氨基酸总量的 40.77%。而支链氨基酸(缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸)含量较高,占氨基酸总量的 24.3%;芳香族氨基酸(苯丙氨酸、酪氨酸)则相对较低,仅占氨基酸总量的 8.76%。有实验发现^[5],对肝病患者输注特别的高支链氨基酸、低芳香族氨基酸的葡萄糖混和液,可使血浆氨基酸水平正常化,从而改善精神神经症状,缓解病情。为此我们可从微囊藻中提取氨基酸制成注射液,可用于临床慢性肝病的肝硬化治疗,使紊乱的血浆氨基酸水平正常化,也为今后微囊藻的利用开辟一条途径。另外,微囊藻中含量最高的谷氨酸 Glu 达 8.28%,可以作为鲜味食品加以开发利用^①。

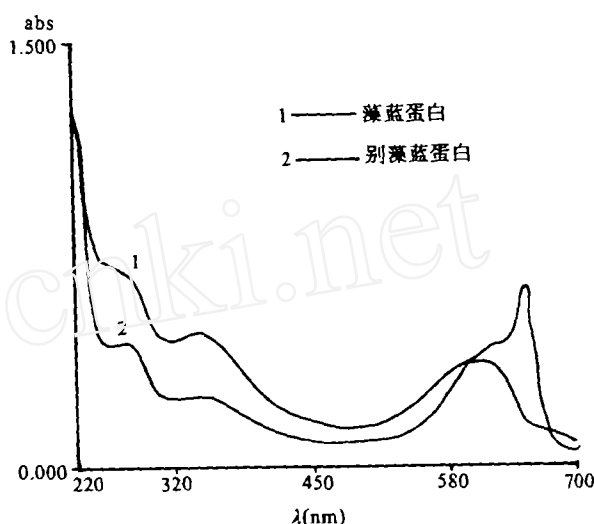


图 1 藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白的紫外—可见光特征吸收光谱曲线

Fig. 1 The uv-vis absorbance spectrum of purified phycocyanin and allophycocyanin of microcystis

表 1 微囊藻中生理氨基酸的组成与含量

Tab. 1 The amino acid compositions and contents in microcystis

氨基酸组成	英文	含量(干重%)	比较项目	氨基酸	含量(干重%)
天冬氨酸	Asp	6.154	人体 8 种必需氨基酸	亮氨酸	5.867
苏氨酸	Thr	3.131		缬氨酸	4.615
丝氨酸	Ser	2.690		赖氨酸	3.039
谷氨酸	Glu	8.279		苏氨酸	3.131
甘氨酸	Gly	3.013		异亮氨酸	3.951
丙氨酸	Ala	5.188		苯丙氨酸	2.723
胱氨酸	Cys	0.305		蛋氨酸	0.882
缬氨酸	Val	4.615		色氨酸	0
蛋氨酸	Met	0.882	部分必需氨基酸	精氨酸	4.206
异亮氨酸	Ile	3.951	含量最多的 2 种氨基酸	组氨酸	0.914
亮氨酸	Leu	5.867		谷氨酸	8.279
酪氨酸	Tyr	2.480	氨基酸的总含量	天冬氨酸	6.154
苯丙氨酸	Phe	2.723			
赖氨酸	Lys	3.039	8 种必需氨基酸含量占氨基酸总量的百分比		59.379
组氨酸	His	0.914			
精氨酸	Arg	4.206			
脯氨酸	Pro	1.942			40.77%
色氨酸	Trp	未测			

① 刘子列,王成毅。Pico-Tag™氨基酸分析法应用报告文集。北京:密理博中国有限公司沃特斯产品业务部。1992。

选择国内淡水湖巢湖中的蓝藻作为研究对象,有许多优点:第一,蓝藻湖靛含蛋白质达50~60%,脂肪约3~5%,碳水化合物15~25%,以及多种氨基酸、维生素和微量元素等,营养十分丰富^①。第二,原料来源丰富。巢湖在水温较高季节会大量出现水华,无需投入大量人力、物力进行培养。第三,大量繁殖的蓝藻湖靛对工业、生活用水已构成威胁,对其进行集中采集利用,是净化水体、变废为宝的有效手段。本试验成功地从巢湖蓝藻湖靛中抽提、分离出藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白,这将为从湖靛中抽提出藻胆蛋白等的工业化生产提供实验依据。

致谢 测试项目“微囊藻中氨基酸的组成与含量”由周万平等提供,一并致谢。

参 考 文 献

- 1 M J 小佩尔扎. 微生物学. 北京: 科学出版社, 1985. 280
- 2 张宪孔, 刘 梅, 刘其芳, 王后乐, 黎尚豪. 蓝藻中藻蓝蛋白的初步分离和光谱特性. 科学通报, 1982, 27(2): 115~117
- 3 黄有馨, 刘志礼. 固氮蓝藻. 北京: 农业出版社, 1984. 78
- 4 方肇伦. 仪器分析在土壤学和生物学中的应用. 北京: 科学出版社, 1983. 138
- 5 李兆兰, 刘雪娟. 真菌菌丝体和发酵液的氨基酸分析比较. 南京大学学报(自然科学版), 1987, 23(3): 443~452

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PHYCOBILIPROTEIN OF CYANOBACTERIAL BLOOM FROM CHAOHU LAKE

Qu Wenchuan¹ Yu Yuansheng¹ Su Chengwei²

(1: Lake Sediment and Environment Laboratory, Nanjing Institute of Geography and Limnology, CAS, Nanjing 210008;
2: Pharmaceutical Factory of Nanjing University, Nanjing 210008)

Abstract

In megathermal climate, a great amount of blue green bloom (mainly consisted of microcystis) is observed to appear in some freshwater lakes of China, i. e. Chaohu Lake. The bloom contains protein, amino acid, fat and some other nutrition substances. In this paper, the amino acid compositions and contents in microcystis were first determined. After extraction and isolation, the phycobiliproteins are purified and further identified, based upon the algal biliproteins' uv-vis absorbance spectrum. The results obtained are satisfactory, which provides an experimental basis for further exploitation and utilization of bloom in Chaohu Lake.

Key Words Chaohu Lake, blue green bloom, phycobiliprotein, amino acid, microcystis

① 吴先成等. 巢湖渔业资源增殖研究资料. 安徽巢湖开发公司, 1982: 1~5.