

滇池水华蓝藻藻蓝蛋白的分离纯化与毒性研究*

沈 强¹ 沈银武² 刘永定^{2*} 刘笔锋¹

(1 华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉, 430074 2 中国科学院水生生物研究所水环境工程中心, 武汉, 430072)

摘 要 采用从昆明滇池机械收获的产毒水华蓝藻为材料, 通过采用抽提、粗过滤、微滤、超滤脱毒(截留分子量 100 kDa)、低温静置离心、真空干燥等提取纯化方法, 从 1kg 微囊藻粉中制备纯度 (A_{620}/A_{280}) 高达 1.80 的 57g 藻蓝蛋白干粉。小鼠急性毒性试验显示, 纯化的藻蓝蛋白无毒性; LD_{50} 大于 $3.71 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 而对照原料藻粉的 LD_{50} 为 $0.10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。Ames 试验结果显示, 5 个藻蓝蛋白剂量组回变菌落数均未超过阴性对照菌落数 2 倍, 亦无剂量-效应关系, Ames 实验结果阴性, 初步通过食品安全性毒理学评价程序。

关键词 水华蓝藻, 滇池, 藻蓝蛋白, 微囊藻毒素, 超滤, 毒性。

目前, 机械收藻已应用到滇池蓝藻水华污染治理工作中^[1]。这种机械方法大量收获蓝藻, 能在短期内减少蓝藻生物量、降低内源水体中氮、磷营养水平并能加快水体生态恢复, 但收获蓝藻的巨大生物量如何进行安全处置, 成为了一个待解决的新问题。滇池蓝藻具有生物量大和蛋白质含量高的特点, 其中藻蓝蛋白含量达细胞干重的 5% 以上^[2]。藻蓝蛋白可用于食品着色剂, 作为一种天然的蓝色色素, 可取代对人类健康不利的合成色素, 同时具有免疫调节能力和抗癌作用, 具有很高的利用价值^[3]。

本文就如何有效地对收获的蓝藻合理利用, 达到既能有效消除环境污染的同时又能有效产生经济效益展开了深入的研究。

1 实验部分

1.1 藻蓝蛋白干粉制备

微囊藻干粉用机械收获的方法^[1]采集自云南滇池, 晒干粉碎后低温干燥保存。1kg 干藻粉加入 20L $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8), 室温下搅拌抽提 3h, 用孔径 $50 \mu\text{m}$ 的尼龙筛绢滤布过滤, 取滤液。滤渣继续添加 10L $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液搅拌抽提, 过滤后合并滤液。用 PP-6 型蠕动泵 (上海离心机械研究所) 做动力, 先后将滤液通过 $2 \mu\text{m}$ 和 $0.45 \mu\text{m}$ 微滤器 (核工业部第八研究所, JA-3011) 进行微滤处理, 得到澄清的藻提取液。

使用 UF-I-50 型中空纤维超滤柱 (核工业部第八研究所, 截留分子量 100 kDa) 与蠕动泵配套使用进行超滤, 操作压力差不超过 0.05 MPa 。超滤截留下的藻蓝蛋白溶液添加等体积蒸馏水后继续超滤, 至超滤效率显著下降时, 继续补充蒸馏水, 如此反复超滤 10 次, 最大程度除去微囊藻毒素等小分子杂蛋白。超滤脱毒处理后的浓缩藻蓝蛋白溶液在 4°C 静置 48h 后, 有大量浅色的絮状沉淀形成。离心 ($6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 15 min) 除去这一部分沉淀。浓缩的藻蓝蛋白溶液用真空干燥器 (Yamatō, NEOCO-OL) 干燥后, 制备得到深蓝色的藻蓝蛋白干粉。

藻蓝蛋白纯度测定根据 Herrera 等^[4]方法, 以 A_{620}/A_{280} 作为藻蓝蛋白纯度指标。藻蓝蛋白含量测定依 Soni^[5] 推荐的公式计算。溶液中藻蓝蛋白含量 = $(A_{620} - 0.7A_{650}) / 7.38 (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$ 。

1.2 藻蓝蛋白干粉的急性毒性实验

小鼠急性毒性试验^[6]: 上述藻蓝蛋白干粉用蒸馏水溶解后, 选雌雄各 10 只 20g 左右的 SPF 级昆明小鼠, 经口灌胃给予藻蓝蛋白溶液 (灌胃前 16h 停食), 连续灌胃三次, 间隔 4h, 累计灌胃剂量为 $5.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 藻蓝蛋白溶液。观察 7d 并记录动物中毒症状及死亡数。同时, 采用小鼠生物测试的方法^[7]对比测定藻粉和纯化的藻蓝蛋白的毒性。

2008 年 8 月 29 日收稿。

* 中国科学院知识创新工程重要方向课题 (KZCX2-YW-426) 和中国博士后科学基金 (20060400848) 资助项目。* * 通讯联系人。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3 鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验 (Ames试验)

用经鉴定符合生物学要求的鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型 TA97, TA98, TA100和 TA102四株菌株进行实验; 多氯联苯诱导的大鼠肝均浆作为体外活化系统 (+S9)^[6]. 分为5个剂量组, 每培养皿加入量为不同浓度的 0.1mL藻蓝蛋白水溶液, 剂量分别为 0.2, 0.5, 1, 2.5和 5mg. 同时设置空白对照组. TA97, TA98, TA102 - S9阳性对照物为 50.0 μ g敌克松, TA100 - S9阳性对照物为 2.5 μ g NaN₃, TA97, TA98, TA100 + S9阳性对照物为 10 μ g 2-氨基芴, TA102 + S9阳性对照物为 50 μ g 1, 8-二羟基蒽醌. 平板渗入法记录二次重复的平行样品结果并用 SPSS 12.0软件对数据进行统计分析.

2 结果与讨论

2.1 藻蓝蛋白固体粉的纯化

以 1kg干藻粉为原料制备得到 57g深蓝色的藻蓝蛋白固体粉末. 经过滤布过滤、2 μ m微滤、0.45 μ m微滤、超滤和低温静置离心分离纯化步骤, 藻蓝蛋白纯度 (A_{620}/A_{280}) 分别为: 0.34, 0.37, 0.40, 1.02和 1.80. 纯度最终提高 5.29倍. 其中, 超滤和低温静置离心是提高藻蓝蛋白纯度的两个关键步骤. 经过低温静置后离心处理, 藻蓝蛋白纯度提升效果最为明显.

图 1A 是第一次超滤纯化时, 以 10L提取液为例, 藻蓝蛋白纯度 (A_{620}/A_{280})、藻蓝蛋白含量和提取液体积的变化情况. 超滤后, 藻蓝蛋白纯度从 0.40 上升到 0.87, 含量从 1.3mg \cdot m⁻¹ 上升至 4.6mg \cdot m⁻¹, 提取液体积由 10L减少到 2.4L. 超滤对藻蓝蛋白纯化的效果十分明显.

经过进一步加水持续超滤 10次后 (图 1B), 藻蓝蛋白纯度有进一步的提升, 从 0.87 提升到 1.02, 和第一次的超滤相比较提升效果不特别显著, 但藻蓝蛋白含量则从 4.6mg \cdot m⁻¹ 大幅提高到 15.5mg \cdot m⁻¹, 上升 3.4倍, 有利于藻蓝蛋白的真空干燥.

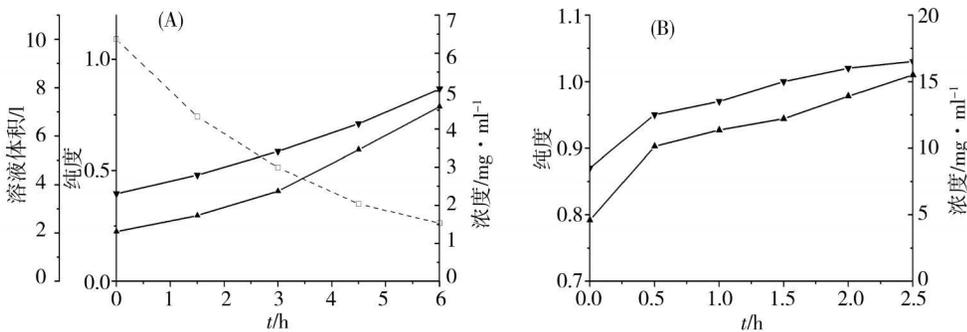


图 1 超滤纯化中藻蓝蛋白纯度、浓度和滤液体积的变化

藻蓝蛋白纯度: \blacktriangle 藻蓝蛋白浓度; \square 超滤液体积

Fig 1 Effects of ultrafiltration on phycocyanin purification, concentration and solution volume

将纯化得到的高度浓缩的藻蓝蛋白提取液 4 $^{\circ}$ C静置 48h 后有大量浅色沉淀形成. 通过测定离心前后的 A_{280} 和 A_{620} 表明: 提取液中作为蛋白质吸收峰的 A_{280} 从 1.009 下降到 0.575 (稀释 25 倍后测定值), 而纯度指标 A_{620}/A_{280} 从 1.02 提高到 1.80, 提高 1.76倍. 初步分析, 浅色沉淀为在高度浓缩的条件下, 随温度降低而析出的杂蛋白, 可见低温静置后离心是简单而有效的纯化步骤.

藻蓝蛋白提取的第一步是破碎藻细胞壁. 通常采用的方法是冻融法、超声破碎法等^[8], 研究中发现, 超声破碎提取法获得的藻蓝蛋白提取液所含细胞碎片及杂蛋白较多, 后处理困难; 而冻融提取法也存在提取时间较长, 细胞破碎效率低的缺点. 因此本研究采用直接抽提干燥后的藻粉的方法, 对在干燥过程中细胞壁遭到破坏的藻细胞进行多次抽提, 可以高效地提取藻蓝蛋白, 同时避免了其它细胞碎片的干扰.

目前, 国内外大规模制备纯化藻蓝蛋白主要是利用盐析、凝胶过滤、吸附色谱及离子交换色谱以

及其它更昂贵的方法, 将超滤应用于藻蓝蛋白纯化的文献较少. Reis等^[9]在其纯化藻蓝蛋白中采用了超滤处理, 超滤后的藻蓝蛋白纯度达到 1.0, Herreai等^[4]也使用超滤纯化方法, 但藻蓝蛋白纯度仅提高到 0.72 而本研究中采用多步超滤结合低温静置离心的方法, 制备的藻蓝蛋白纯度达 1.80

2.2 藻蓝蛋白固体粉的毒性

通过对滇池同期同一采样点的水华蓝藻样品的显微镜观察, 铜绿微囊藻的优势度在 90% 以上. 经 HPLC方法检测^[10], 藻粉中微囊藻毒素总含量为 $0.818\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 包含 MC-RR和 MC-LR两种异构体, 含量分别为 $0.720\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $0.098\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$. 而微囊藻毒素用常规净水工艺无法有效去除^[11], 因此有必要对藻蓝蛋白产品的生物安全性进行进一步的检测.

根据小鼠急性毒性试验的结果, 通过累计三次灌胃总量相当于 $5.25\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的藻蓝蛋白溶液, 1周内未观察到动物中毒症状及死亡发生. 按急性毒性分级, 制备得到的藻蓝蛋白属实际无毒级; 同时生物测试的结果进一步表明, 藻粉的 LD_{50} 为 $0.10\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 而经过超滤纯化后得到的藻蓝蛋白的 $\text{LD}_{50} > 3.71\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 毒性至少下降 97.3% 以上, 和 Gijbertsen-Abrahamse等^[12]采用超滤、纳米过滤去除藻毒素的实验结果大致相同.

二次平行的 Ames实验结果均显示(表 1), 鼠伤寒沙门氏菌 TA97, TA98, TA100和 TA102 4个实验菌株, 在加与不加体外代谢活化系统 S9时, 5个藻蓝蛋白剂量组的平均回变菌落数与平均自发回变数的比值均小于 2. 样品组与阳性对照组相比有显著差异 ($P < 0.01$). 同时, 不同剂量藻蓝蛋白组回变菌落数, 在 TA97, TA98, TA100和 TA102组的活化与非活化条件下, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$). 数据证明浓度不同并未带来毒理学上的不同影响, 无剂量-效应关系. 结果表明藻蓝蛋白制品对鼠伤寒沙门氏菌无诱变活性, 无致突变作用. Ames实验结果阴性.

表 1 藻蓝蛋白 Ames实验结果
Table 1 Ames test results of phycocyanin

试样来源	剂量 / μg	回变菌落数 /个·皿 ⁻¹							
		TA97- S9	TA97+ S9	TA98- S9	TA98+ S9	TA100- S9	TA100+ S9	TA102- S9	TA102+ S9
阴性对照		159 ± 9.6	159 ± 7.2	43 ± 2.6	42 ± 2.6	149 ± 2.5	163 ± 6.0	232 ± 2.6	234 ± 11.7
		157 ± 8.4	155 ± 6.5	45 ± 4.9	44 ± 2.1	158 ± 6.4	161 ± 7.2	238 ± 7.5	235 ± 6.2
自发回变		158 ± 9.6	159 ± 2.0	43 ± 2.6	45 ± 4.2	159 ± 8.1	162 ± 5.3	241 ± 3.0	232 ± 12.0
		155 ± 6.5	156 ± 4.7	41 ± 2.6	41 ± 2.1	163 ± 8.5	164 ± 5.7	235 ± 9.3	227 ± 15.3
藻蓝蛋白	200	141 ± 1.0	142 ± 1.0	45 ± 2.5	43 ± 2.5	164 ± 3.2	163 ± 2.0	263 ± 1.5	263 ± 3.2
		145 ± 1.5	145 ± 1.5	43 ± 4.5	46 ± 1.2	161 ± 2.0	162 ± 1.0	262 ± 4.5	264 ± 1.0
	500	144 ± 1.0	145 ± 2.5	45 ± 1.5	44 ± 3.0	164 ± 2.5	163 ± 4.2	265 ± 2.6	265 ± 4.4
		144 ± 2.1	144 ± 4.0	44 ± 4.0	46 ± 1.5	163 ± 1.5	163 ± 2.1	265 ± 2.1	263 ± 2.6
	1000	145 ± 2.1	142 ± 7.2	47 ± 1.0	46 ± 1.0	164 ± 1.0	165 ± 2.0	262 ± 2.6	267 ± 3.2
		145 ± 4.2	144 ± 1.5	42 ± 2.5	46 ± 2.1	163 ± 3.8	163 ± 3.1	265 ± 2.1	263 ± 2.6
	2500	147 ± 2.0	143 ± 2.6	46 ± 1.5	45 ± 1.5	163 ± 2.0	163 ± 3.0	266 ± 2.1	265 ± 3.1
		142 ± 1.5	146 ± 3.0	44 ± 4.0	47 ± 1.5	165 ± 2.1	164 ± 1.5	269 ± 1.5	267 ± 5.9
	5000	146 ± 1.0	146 ± 1.5	46 ± 1.0	45 ± 1.5	165 ± 1.5	164 ± 1.0	267 ± 2.0	266 ± 3.1
		147 ± 3.1	147 ± 5.3	44 ± 4.0	46 ± 4.9	164 ± 3.2	165 ± 4.2	268 ± 2.5	264 ± 3.5
	阳性对照								
	NaN ₃	2.5	—	—	—	—	1517 ± 181.5	—	—
—			—	—	—	1640 ± 62.4	—	—	—
2-AF	10.0	—	1093 ± 102	—	1883 ± 70.2	—	1947 ± 68.1	—	—
		—	1103 ± 56.9	—	1887 ± 80.8	—	1950 ± 52.9	—	—
敌克松	50.0	2357 ± 165	—	2153 ± 55.1	—	—	—	1020 ± 10.0	—
		2543 ± 146	—	2230 ± 193	—	—	—	1113 ± 85.0	—
1,8-二羟 基萘醌	50.0	—	—	—	—	—	—	1493 ± 75.1	
基萘醌		—	—	—	—	—	—	1527 ± 61.1	

小鼠急性毒性试验和 Ames 试验结果表明, 纯化的藻蓝蛋白粉能初步通过食品安全性毒理学评价程序的检验. 本研究获得的藻蓝蛋白安全无毒的原因有可能是采取多步超滤的结果. 由于微囊藻毒素分子量在 1000 左右, 远小于 10 万, 且易溶于水, 能随水分透过中空纤维超滤柱排出. 因此, 通过持续补充水分反复超滤, 微囊藻毒素会持续随水分排出, 其浓度将不断降低而达到较彻底的脱毒, 水分补充的越多, 脱毒效果就越好. 利用水华蓝藻来分离藻蓝蛋白, 有必要进行持续加水超滤这一关键的脱毒纯化步骤.

根据文献, 国内外研究藻蓝蛋白纯化所采用的原料, 多以螺旋藻为主; 很少涉及到藻类来源及纯化的藻蓝蛋白的毒性研究. 由于藻类在生长过程容易受到重金属、有机污染物的污染^[13, 14], 同时市售的螺旋藻中可能混杂有产毒藻类, 且某些种类螺旋藻本身产毒^[15], 可能对人类健康产生潜在的危害. 据此本研究对超滤纯化后藻蓝蛋白进行了小鼠急性毒性试验和 Ames 试验的安全性评价, 结果发现经过本研究工艺流程所获得的藻蓝蛋白是无毒安全的.

3 结论

本研究采用抽提、微滤、超滤等方法, 从水华蓝藻干粉中获得了大量较高纯度的藻蓝蛋白 ($A_{620}/A_{280} = 1.02$), 结合低温静置离心法进一步提高藻蓝蛋白纯度, 获得了高品质的藻蓝蛋白产品 ($A_{620}/A_{280} = 1.8$); 从 1kg 微囊藻藻粉中纯化得到 57g 深蓝色的藻蓝蛋白, 纯度达 1.80. 小鼠毒性试验结果显示纯化的藻蓝蛋白为无毒级, LD_{50} 大于 $3.71 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 而藻粉的 LD_{50} 为 $0.10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 纯化得到的藻蓝蛋白产品是安全的. Ames 试验结果显示, 5 个藻蓝蛋白剂量组的回变菌落数均未超过阴性对照菌落数 2 倍, 亦无剂量-效应关系, Ames 实验结果阴性, 表明纯化的藻蓝蛋白是安全无毒的.

参 考 文 献

- [1] 沈银武, 刘永定, 吴国樵等, 富营养湖泊滇池水华蓝藻的机械清除 [J]. 水生生物学报, 2004, 28 (2) : 131—136
- [2] 范良民, 滇池蓝藻成份分析及利用途径探讨 [J]. 云南环境科学, 2000, 19 (1) : 35—37
- [3] Ram n R B Ak rez-Pez JM, A cin FG et al, Recovery of Pure B-Phycocyanin from the Microalgae *Porphyridium cruentum* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2002, 93 : 73—85
- [4] Herrera A, Boussiba S, Napo kone V et al, Recovery of C-Phycocyanin from the Cyanobacterium *Spirulina maxima* [J]. *Journal of Applied Phycology*, 1989, 1 : 325—331
- [5] Soni B, Kalavadi B, Trivedi U, Extraction, Purification and Characterization of Phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata*—Isolated from the Rocky Shores of Bet Dwarka Gujarat India [J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41 (9) : 2017—2023
- [6] 卫生部食品卫生监督所, GB 15193.1-2003 保健食品安全性毒理学评价程序和检验方法规范 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2003
- [7] 何振荣, 俞加禄, 何家苑等, 东湖蓝藻水华毒性的研究 [J]. 水生生物学报, 1989, 13 (3) : 201—209
- [8] 吴蕾, 庞广昌, 陈庆森, 螺旋藻藻蓝蛋白的规模化提取和色谱纯化技术研究进展 [J]. 食品科学, 2008, 29 (4) : 461—463
- [9] Reis A, Mendes A, Lobo-Fernandes H et al, Production, Extraction and Purification of Phycobiliproteins from *Nostoc* sp [J]. *Bioresource Technology*, 1998, 66 (3) : 181—187
- [10] Harada K, Matsuura K, Suzuki M et al, Analysis and Purification of Toxic Peptides from Cyanobacteria by Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 1988, 448 (2) : 275—283
- [11] 朱光灿, 吕锡武, 藻毒素在传统净水工艺中的去除特性 [J]. 环境化学, 2002, 21 (6) : 585—589
- [12] Gijbetsen-Abrahamse A J, Schmidt W, Chorus I et al, Removal of Cyanotoxins by Ultrafiltration and Nanofiltration [J]. *Journal of Membrane Science*, 2006, 276 : 252—259
- [13] 吴海锁, 张洪玲, 张爱茜等, 小球藻吸附重金属离子的试验研究 [J]. 环境化学, 2004, 23 (2) : 173—177
- [14] 孙红文, 黄国兰, 藻类与有机污染物间的相互作用研究 [J]. 环境化学, 2003, 22 (5) : 440—444
- [15] Camichael W, The Toxins of Cyanobacteria [J]. *Scientific American*, 1994, 270 (1) : 78—86

STUDIES ON PURIFICATION AND TOXICITY OF PHYCOCYANIN FROM WATERBLOOM FORMING CYANOBACTERIA IN DIANCHILAKE

SHEN Qiang¹ SHEN Yin-wei² LIU Yong-ding² LIU Bifeng¹

(1 College of Life Science, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China

2 Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

ABSTRACT

A high efficient purification method had been developed to obtain high purity phycocyanin from the toxic cyanobacterial bloom harvested from Dianchi lake, which included extraction, colation, microfiltration, ultrafiltration (100000 MW cut-off unit), centrifugalization after cold preservation and vacuum drying. With this method, 57g high purity phycocyanin ($A_{620}/A_{280} = 1.80$) was got from 1kg dry powder of *Microcystis*. The acute toxicity tests in mice showed the purified phycocyanin was nontoxic and LD_{50} of it was greater than $3.71 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ as determined in the mice by intraperitoneal injection, while that of dry powder of cyanobacterial bloom was $0.10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Ames test results also were negative, which indicated the product of phycocyanin passed procedures for toxicological assessment of food.

Keywords cyanobacteria, Dianchi lake, phycocyanin, microcystin, ultrafiltration, toxicity.

第四届中国环博会将在上海新国际博览中心举办

为配合上海世博会, 原定于 2010 年 7 月举办的第四届中国环博会 (双年展) 现提前至 2010 年 5 月 4 日至 6 日在上海新国际博览中心举办。

本届中国环博会将和 5 月 1 日开幕的 2010 年上海世博会同期开展, 令众多展商和观众能够在参与环博会之外获得参与世博会的机会。 “第四届中国环博会以环保解决方案为主线, 也十分切合 2010 年世博会的口号——城市, 让生活更美好。” 德国慕尼黑国际博览集团副总裁艾欧恒先生解释说。

除了和世博会同期举办的优势外, 还有诸多因素令德国慕尼黑国际博览集团坚信本届中国环博会将续写辉煌: 2008 年第三届中国环博会吸引了来自 25 个国家的 362 家展商, 较 2006 年增长达 27%, 以及来自 72 个国家的 10500 名观众, 较 2006 年增长了近 10%。

同时, 世界规模最大的国际环保科技博览会第 16 届德国慕尼黑国际环博会 (IFAT) 由 3 年一届改为 2 年一届, 将提前至 2010 年 9 月 13—17 日举办。正是由于目前环境市场不断增长的势头以及行业对 IFAT 展会期待的加深, 使得慕尼黑国际博览集团做出了缩短展会周期的决定。

本刊讯