

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910026902.1

[51] Int. Cl.

C07K 14/795 (2006.01)

C07K 14/405 (2006.01)

C07K 1/14 (2006.01)

C08F 12/18 (2006.01)

C08F 8/32 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 10 月 21 日

[11] 公开号 CN 101560254A

[22] 申请日 2009.5.19

[21] 申请号 200910026902.1

[71] 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号
江南大学化学与材料工程学院

[72] 发明人 王 峰 高 瑾 崔正刚

[74] 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
代理人 时旭丹 刘品超

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称

一种蓝藻藻蓝蛋白的富集分离方法

[57] 摘要

一种蓝藻藻蓝蛋白的富集分离方法,属于生化分离工程技术领域。本发明步骤为:蓝藻破壁液的制备;JDN-3 型树脂富集蓝藻破壁液中的藻蓝蛋白;洗脱分离藻蓝蛋白;JDN-3 型树脂层析分离;洗脱液在脱盐后进行冷冻干燥,获得一定纯度的藻蓝蛋白;蛋白回收率最高可达 85.5%。该方法简单,对蓝藻破壁液直接使用 JDN-3 型树脂进行富集,不采用通常的硫酸铵盐析、有机溶剂、等电点等方法,降低了制备过程中化学试剂使用量,简化了纯化过程的步骤,避免了产品损失,使用 JDN-3 型树脂层析后所得的藻蓝蛋白具有较高纯度,纯度达到 $A_{620}/A_{280} > 2.2$ 。原料采用鲜藻或干藻粉,甚至是野外的太湖水华蓝藻,从而提供了一种解决藻类资源规模化利用的技术方法。

1、一种蓝藻藻蓝蛋白的富集分离方法，其特征在于步骤为：蓝藻破壁液的制备；JDN-3 型树脂富集蓝藻破壁液中的藻蓝蛋白；洗脱分离藻蓝蛋白；JDN-3 型树脂层析分离；洗脱液在脱盐后进行冷冻干燥，获得一定纯度的藻蓝蛋白；

(1) 蓝藻破壁液的制备：采用水作提取剂，藻粉或鲜藻与水的固液质量比为 1:1~1:10，搅拌均匀后，置于-10℃~-20℃下冷冻一定时间后，37℃融解，如此反复冻融 4-6 次；融化后的蓝藻破壁液 4800-18000 r/min 离心 10-30min，取上层清液；

(2) JDN-3 型树脂富集蓝藻破壁液中的藻蓝蛋白：在容器中加入蓝藻破壁液和 JDN-3 型树脂，蓝藻破壁液中蛋白质浓度为 10~35mg/mL，JDN-3 型树脂在蓝藻破壁液中的重量体积百分浓度为 5%~20%，密闭后，25~35℃下，在振荡器上振荡 4~10 小时，振荡器转速为 100r/min，振荡结束后，经过抽滤，获得饱和吸附藻蓝蛋白的 JDN-3 型树脂；

(3) 洗脱分离藻蓝蛋白：将步骤 2 中获得的饱和吸附藻蓝蛋白的 JDN-3 型树脂，用含 0.1~0.5mol/L 氯化钠的 0.005~0.5mol/L 的磷酸缓冲液多次洗涤，收集含藻蓝蛋白的洗脱液，透析脱盐后，真空浓缩获得浓缩液；

(4) JDN-3 型树脂层析分离：采用湿法，将 JDN-3 型树脂加到层析柱内，使之自然沉降，直至达到所需的高度为止，将多余的液体放出，使液面刚好与柱床表面一致，步骤 3 中获得的浓缩液的加入量为床层体积的 1/10；

待浓缩液中的蛋白被完全吸附后，用含 0.1~0.5mol/L 氯化钠的 0.005~0.5mol/L 的磷酸缓冲液梯度洗脱，控制流速在 0.5~2 mL/min，收集富含藻蓝蛋白的洗脱液段；

(5) 透析脱盐、冷冻干燥：将收集的藻蓝蛋白洗脱液透析脱盐，最后冷冻干燥，得到纯度 $A_{620}/A_{280} > 2.2$ 的高纯度藻蓝蛋白粉末。

2、根据权利要求 1 所述的蓝藻藻蓝蛋白的富集分离方法，其特征在于蓝藻的种类为蓝藻或螺旋藻干粉，或新鲜的螺旋藻，或取自野外的由多种微藻组成的太湖水华蓝藻。

3、根据权利要求 1 所述的蓝藻藻蓝蛋白的富集分离方法，其特征在于 JDN-3 型树脂制备：在容器中，放入氯甲基化聚苯乙烯树脂球即交联度 10%的氯球和有机溶剂，氯球与有机溶剂的重量比为 1:8~15，通入氮气保护，分散溶胀 2~12 小时，在适当的搅拌下，加入多乙烯多胺，多乙烯多胺与氯球的重量比为 2~12:1，加入多乙烯多胺重量 0.05%~0.1%的催化剂，加热到 70℃~90℃，搅拌反应 4~16 小时，胺化后的树脂用甲醇、四氢呋喃、去离子水依次洗涤至中性，用质量浓度 1%硝酸银溶液检测至洗涤后无氯离子存在，即得 JDN-3 型树脂；

所述有机溶剂选用 N,N-二甲基甲酰胺、吡啶、1,4-二氧六环或四氢呋喃；

所述催化剂选用二氯化锡、氧化镁、三氯化铁或氯化钴。

一种蓝藻藻蓝蛋白的富集分离方法

技术领域

本发明提供一种从蓝藻中提取分离高纯度藻蓝蛋白的简单、快捷的方法。属于生化分离工程技术领域。

背景技术

藻蓝蛋白是存在于蓝藻和红藻等微藻的藻胆体中的一类色素复合蛋白。藻胆体是红藻和蓝藻所特有的一种超分子捕光色素复合体。藻胆体是由脱辅基蛋白和藻蓝蛋白（开链的四吡咯发色团）通过一个或者两个硫醚键共价连接而成的结合蛋白。藻蓝蛋白的 α 亚基含1个藻蓝素， β 亚基含有2个藻蓝素。藻蓝蛋白具有很高的开发利用价值。藻蓝蛋白色泽明亮鲜艳，是食品、高级眼影、唇膏的首选纯天然色素，可作为纯天然的色素，用于食品、化妆品和染料等工业。藻蓝蛋白还可以调节和合成人体代谢所需要的多种重要酶，具有明显的抗氧化、抗炎症作用，能清除辐射以及选择性的抑制加氧酶-2 的活性，调节人体免疫系统，增强免疫系统功能，提高人体对疾病的抵抗能力。高纯度的藻蓝蛋白带有很强的荧光，制成的纯天然荧光试剂，用于临床医学诊断，免疫化学及生物工程等研究领域。研究表明，藻蓝蛋白能显著减轻并逐渐消除辐射、化疗对造血功能的损伤，还能提高淋巴细胞活性，积极清除细胞中氧自由基，促进伤口愈合。动物实验证明，藻蓝蛋白还是一种具有开发潜力的光敏剂，用于肿瘤的光动力治疗，有效抑制癌细胞生长。因此，藻蓝蛋白的应用前景范围广阔，具有很高的开发、利用价值。

我国目前的经济微藻（主要为蓝藻和蓝绿藻）的开发和利用处于初级加工阶段，多以微藻藻片和胶囊的形式当作保健品使用，还没有微藻深加工产品。蓝藻和蓝绿藻中藻蓝蛋白的提取还处于实验室研究阶段，没有适合于工业化生产的好的工艺方法，而使藻蓝蛋白的商品价格昂贵因而在应用上受到限制。

因此，对藻蓝蛋白的提取过程进行开发，提高纯度是目前藻蓝蛋白开发利用亟待解决的关键问题。已报道的有关制备藻蓝蛋白的专利技术，例如中国专利 CN1106414A、CN1130028A、CN101003565A、CN00117512.2、CN100434528C 等的共同特征为藻蓝蛋白提取都需经过破壁、盐析或等电点粗提阶段，提取率不高，生产成本增加，过程繁琐。

发明内容

本发明的目的是提供一种蓝藻藻蓝蛋白的富集分离方法，通过自制的新型树脂 JDN-3 自蓝藻破壁液中直接富集和分离藻蓝蛋白，从而简化藻蓝蛋白的提

取步骤,降低生产成本,提高生产强度。获得较高纯度的藻蓝蛋白,应用于天然色素、保健食品和新药的研究开发。

本发明所要解决的技术问题是提供一种从蓝藻的破壁液,不经盐析、等电点等方法处理,用特性树脂直接富集和层析分离藻蓝蛋白的技术。其方法简单,快捷,运行成本低,所得的藻蓝蛋白具有较高的回收率、纯度,原料既可采用鲜藻也可采用干藻粉,甚至是野外的太湖水华蓝藻,从而提供了一种解决藻类资源规模化利用的问题。

本发明的技术方案:一种蓝藻藻蓝蛋白的富集分离方法,步骤为:

(1) 蓝藻破壁液的制备;(2) JDN-3 型树脂富集蓝藻破壁液中的藻蓝蛋白;(3) 洗脱分离藻蓝蛋白;(4) JDN-3 型树脂层析分离;(5) 洗脱液在脱盐后进行冷冻干燥,最终获得一定纯度的藻蓝蛋白。

所述的方案,步骤 1 中,对于蓝藻的细胞破壁,采用水作提取剂,藻粉或鲜藻与水的固液质量比为 1:1~1:10,搅拌均匀后,置于-10℃~-20℃下冷冻一定时间后,37℃融解,如此反复冻融 4-6 次;融化后的蓝藻破壁液 4800-18000 r/min 离心 10-30min。取上层清液。

所述的方案,步骤 2 中,在容器中加入蓝藻破壁液和 JDN-3 型树脂,蓝藻破壁液中蛋白质浓度为 10~35mg/mL, JDN-3 型树脂在蓝藻破壁液中的重量体积百分浓度为 5%~20%。密闭后,25~35℃下,在振荡器上振荡 4~10 小时,振荡器转速为 100r/min。振荡结束后,经过抽滤,获得饱和吸附藻蓝蛋白的 JDN-3 型树脂。

所述的方案,步骤 3 中,将步骤 2 中获得的饱和吸附藻蓝蛋白的 JDN-3 型树脂,用 0.005~0.5mol/L 的磷酸缓冲液(含 0.1~0.5mol/L 氯化钠)多次洗涤,收集含藻蓝蛋白的洗脱液。透析脱盐后,真空浓缩,获得浓缩液。

所述的方案,步骤 4 中,采用湿法,将 JDN-3 型树脂加到层析柱内,使之自然沉降,直至达到所需的高度为止,将多余的液体放出,使液面刚好与柱床表面一致,步骤 3 中获得的浓缩液的加入量约为床层体积的 1/10。

浓缩液中的蛋白被完全吸附后,用 0.005~0.5mol/L 的磷酸缓冲液(含 0.1~0.5mol/L 氯化钠)梯度洗脱,收集富含藻蓝蛋白的洗脱液段。

所述的方案,步骤 5 中,将收集的藻蓝蛋白的洗脱液透析脱盐,最后冷冻干燥,即获得纯度 $A_{620}/A_{280}>2.2$ 的高纯度藻蓝蛋白粉末。

蓝藻的种类为蓝藻或螺旋藻干粉,或新鲜的螺旋藻,或取自野外的由多种微藻组成的太湖水华蓝藻。

所述的方案中 JDN-3 型树脂采用如下方法制备:在容器中,放入氯甲基化聚苯乙烯树脂球(氯球,交联度 10%,购自上海劲凯树脂有限公司,平均粒径 340 μ m)和有机溶剂(N,N-二甲基甲酰胺、吡啶、1,4-二氧六环或四氢呋喃),

氯球与有机溶剂的重量比为 1 : 8~15, 通入氮气保护, 分散溶胀 2~12 小时, 在适当的搅拌下, 加入多乙烯多胺, 多乙烯多胺与氯球的重量比为 2~12 : 1, 加入多乙烯多胺重量 0.05%~0.1% 的催化剂 (二氯化锡、氧化镁、三氯化铁或氯化钴), 加热到 70 °C~90 °C, 搅拌反应 4~16 小时。胺化后的树脂用甲醇、四氢呋喃、去离子水依次洗涤至中性, 用质量浓度 1 % 硝酸银溶液检测至洗涤后无氯离子存在, 即得 JDN-3 型树脂。

本发明的有益效果: 本发明与现有技术相比, 主要具有以下优点: 1. 按流程: 蓝藻, 细胞破碎, 离心, 富集, 洗脱, 层析, 脱盐, 冷冻干燥, 藻蓝蛋白纯度可达到 $A_{620}/A_{280} > 4.5$, 提取率和纯度显著得到提高。2. 柱层析用自制的 JDN-3 型树脂, 对藻蓝蛋白的吸附性强, 生产成本低, 可再生, 适用于大规模工业化应用。3. 蓝藻破壁液不需经过通常使用的硫酸铵盐析、有机溶剂、等电点等方法进行粗分离, 直接使用自制的 JDN-3 型树脂进行富集, 蛋白回收率最高可达 85.5 %, 藻蓝蛋白的光谱纯度至少可达 $A_{620}/A_{280} > 2.2$ 。降低了制备过程中化学试剂使用量, 简化了纯化过程的步骤, 避免了产品损失。4. 制备藻蓝蛋白的原料可以是鲜藻或者干藻粉, 甚至野生的太湖水华蓝藻, 有效地解决藻类资料的利用和高值化问题。

具体实施方式

实施例 1

(1) 蓝藻破壁液的制备

取产于江苏东台的纯顶螺旋藻干粉, 用去离子水作提取剂, 藻粉与去离子水的固液比为 1 : 10, 置于 -20 °C 下冷冻 4 小时后, 37 °C 融解, 如此反复冻融 4 次。融化后的蓝藻破壁液在 4800-18000 r/min 离心 10-30 min, 取上清液, 得到藻蓝蛋白纯度为 $A_{620}/A_{280} > 0.41$ 的蓝藻破壁液。

(2) JDN-3 型树脂的制备

在 1L 的搅拌釜中, 放入 40g 氯球 (交联度 10%, 购自上海劲凯树脂有限公司, 平均粒径 340 μm) 和 420 mL 的 N,N-二甲基甲酰胺, 通入氮气保护, 在 100 r/min 的搅拌转速下分散溶胀 4 小时, 加入多乙烯多胺 200 g 和 0.2 g 二氯化锡, 加热到 70 °C, 搅拌反应 4 小时。胺化后的树脂用甲醇、四氢呋喃、去离子水依次洗涤至中性, 用 1 % 硝酸银溶液检测至无氯离子存在, 即得 JDN-3 型树脂。

(3) 藻蓝蛋白的直接富集

在 500 mL 具塞三角瓶中加入 50 mL 蓝藻破壁液和 10g JDN-3 型树脂。蓝藻破壁液预先用去离子水稀释到蛋白质浓度为 22.5 mg/mL, 密闭后, 在振荡器上于 32 °C 下振荡 6 小时, 振荡器转速为 100 r/min。振荡结束后, 经过抽滤, 获得饱和吸附藻蓝蛋白的 JDN-3 型树脂。

(4) 藻蓝蛋白从 JDN-3 型树脂上洗脱

将饱和吸附藻蓝蛋白的 JDN-3 型树脂, 用 0.25 mol/L 的磷酸缓冲液 (含 0.3mol/L 氯化钠) 多次洗涤, 收集含藻蓝蛋白的洗脱液, 透析脱盐后在 30℃ 真空浓缩到蛋白质含量为 35 mg/mL。

(5) 藻蓝蛋白的层析纯化

采用湿法装柱, 将 JDN-3 型树脂和去离子水加到层析柱内, 使之自然沉降, 直至达到所需的高度为止, 将多余的去离子水放出, 使液面刚好与柱床表面一致。加藻蓝蛋白液, 所加量约为柱床体积的 1/10, 静置 1 小时, 待蛋白质被完全吸附后, 用 0.005、0.05、0.1、0.2、0.4 mol/L 磷酸缓冲液 (含 0.2 mol/L 氯化钠) 梯度洗脱, 收集富含藻蓝蛋白的洗脱液。收集的藻蓝蛋白的洗脱液透析脱盐, 冷冻干燥, 得到藻蓝蛋白 $A_{620}/A_{280} > 5.0$ 。

实施例 2

(1) 蓝藻破壁液的制备

取产于江苏无锡太湖的新鲜微藻, 加入自来水作提取剂, 固液比为 1 : 2, 以实施例 1 同样步骤方法制备蓝藻破壁液, 藻蓝蛋白纯度为 $A_{620}/A_{280} > 0.25$ 。

(2) JDN-3 型树脂的制备

在 1L 的搅拌釜中, 放入 40 g 氯球 (交联度 10%) 和 380 mL 的 1,4-二氧六环, 通入氮气保护, 在 100 r/min 的搅拌转速下分散溶胀 6 小时, 加入多乙烯多胺 158 g 和 0.08 g 氧化镁, 加热到 80 °C, 搅拌反应 10 小时。胺化后的树脂用甲醇、四氢呋喃、去离子水依次洗涤至中性, 用 1 % 硝酸银溶液检测至无氯离子存在。

(3) 藻蓝蛋白的直接富集

在 500 mL 具塞三角瓶中加入 50 mL 蓝藻破壁液和 5 g JDN-3 型树脂, 蓝藻破壁液中蛋白含量约为 11.5 mg/mL。密闭后, 在振荡器上于 25℃ 下振荡 8 小时, 振荡器转速为 100r/min。振荡结束后, 经过抽滤, 获得饱和吸附藻蓝蛋白的 JDN-3 型树脂。

(4) 藻蓝蛋白从 JDN-3 型树脂上洗脱

将饱和吸附藻蓝蛋白的 JDN-3 型树脂, 用 0.3 mol/L 的磷酸缓冲液 (含 0.2 mol/L 氯化钠) 多次洗涤, 收集含藻蓝蛋白的洗脱液, 透析脱盐后在 30℃ 下真空浓缩到蛋白质含量为 32 mg/mL。

(5) 藻蓝蛋白的层析纯化

采用湿法装柱, 将 JDN-3 型树脂和去离子水加到层析柱内, 使之自然沉降, 直至达到所需的高度为止, 将多余的去离子水放出, 使液面刚好与柱床表面一致。加步骤 4 中获得的藻蓝蛋白液, 所加量约为柱床体积的 1/10, 静置 1 小时, 待蛋白质被完全吸附后, 用 0.005、0.05、0.1、0.2、0.4 mol/L 磷酸缓冲液 (含 0.2 mol/L 氯化钠) 梯度洗脱, 收集富含藻蓝蛋白的洗脱液。收集的藻蓝蛋白的

洗脱液透析脱盐，冷冻干燥，得到藻蓝蛋白 $A_{620}/A_{280} > 2.25$ 。

实施例 3

(1) 蓝藻破壁液的制备

取产于江苏盐城的新鲜螺旋藻，加入自来水作提取剂，固液比为 1 : 5，以实施例 1 同样步骤方法制备蓝藻破壁液，藻蓝蛋白纯度为 $A_{620}/A_{280} > 0.5$ 。

(2) JDN-3 型树脂的制备

在 1L 的搅拌釜中，放入 40g 氯球（交联度 10%）和 360mL 的吡啶，通入氮气保护，在 100 r/min 的搅拌转速下分散溶胀 8 小时，加入多乙烯多胺 100 g 和 0.05 g 氯化钴，加热到 90 °C，搅拌反应 4 小时。胺化后的树脂用甲醇、四氢呋喃、去离子水依次洗涤至中性，用 1 % 硝酸银溶液检测至无氯离子存在。

(3) 藻蓝蛋白的直接富集

在 500 mL 具塞三角瓶中加入 50 mL 蓝藻破壁液和 10 g JDN-3 型树脂，蓝藻破壁液中蛋白含量约为 30.5 mg/mL。密闭后，在振荡器上于 30°C 下振荡 6 小时，振荡器转速为 100 r/min。振荡结束后，经过抽滤，获得饱和吸附藻蓝蛋白的 JDN-3 型树脂。

(4) 藻蓝蛋白从 JDN-3 型树脂上洗脱

将饱和吸附藻蓝蛋白的 JDN-3 型树脂，用 0.5 mol/L 的磷酸缓冲液（含 0.25 mol/L 氯化钠）多次分批洗涤，收集含藻蓝蛋白的洗脱液，透析脱盐后在 30°C 真空浓缩到蛋白质含量为 32 mg/mL。

(5) 藻蓝蛋白的层析纯化

采用湿法装柱，将 JDN-3 型树脂和去离子水加到层析柱内，使之自然沉降，直至达到所需的高度为止，将多余的去离子水放出，使液面刚好与柱床表面一致。加步骤 4 中获得的藻蓝蛋白液，所加量约为柱床体积的 1/10，静置 1 小时，待蛋白质被完全吸附后，用 0.005、0.01、0.05、0.1、0.15、0.3mol/L 磷酸缓冲液（含 0.2mol/L 氯化钠）梯度洗脱，收集富含藻蓝蛋白的洗脱液。收集的藻蓝蛋白的洗脱液透析脱盐，冷冻干燥，得到藻蓝蛋白 $A_{620}/A_{280} > 4.5$ 。