

钝顶螺旋藻藻蓝蛋白的提取工艺研究

沈向阳, 梁霄, 付云, 余炼, 白云霞, 姜毅, 刘小玲

(广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004)

摘要: 为了研究钝顶螺旋藻藻蓝蛋白提取工艺的最佳条件, 本文以钝顶螺旋藻干粉为原料, 探讨高速匀浆法提取藻蓝蛋白过程中的各因素对其得率和产品纯度的影响。通过单因素与正交试验, 确定最佳提取条件。结果表明: 采用 pH 7.0 的 PBS 缓冲液为提取溶剂时, 藻蓝蛋白得率最高为 157.75 mg/g。经优化, 当缓冲液溶剂添加量 20 倍, 提取温度 30 °C, 分 3 次匀浆提取共 40 min 时藻蓝蛋白得率达 213.32 mg/g。比较乙醇沉淀法、酸沉淀法和盐沉淀法对藻蓝蛋白回收率的影响, 结果表明采用 50% 的硫酸铵沉淀法藻蓝蛋白回收率达 97.10%, 藻蓝蛋白的纯度最高。采用高速匀浆法处理提取藻蓝蛋白, 采用 30% 和 50% 分步盐析回收藻蓝蛋白, 以本方法可获得纯度 0.7 以上的藻蓝蛋白 239.70 mg/g 干粉。经紫外可见光谱扫描显示, 提取的藻蓝蛋白与藻蓝蛋白标品光谱特征一致。

关键词: 钝顶螺旋藻; 藻蓝蛋白; 提取; 回收率

文章编号: 1673-9078(2019)07-198-204

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.7.027

Study of the Extraction Process of Phycocyanin from *Spirulina platensis*

SHEN Xiang-yang, LIANG Xiao, FU Yun, YU Lian, BAI Yun-xia, JIANG Yi, LIU Xiao-ling

(College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: In order to investigate the best extraction technology of phycocyanin from *Spirulina platensis* (*A. platensis*), the *Spirulina platensis* dry powder was used as raw material to evaluate the effects of high-speed homogenization on extraction yield of phycocyanin. The extraction conditions were optimized by means of single factor test and orthogonal designed experiments. Results showed that the extraction yield of phycocyanin was 157.75 mg/g when pH 7.0 PBS buffer as solvent was chose. The optimized condition was as follows: The solid-liquid ratio of 1:20, the extraction temperature of 30 °C, the extraction time of 40 min and the extraction times of 3. At this condition, the extraction yield of phycocyanin was 213.32 mg/g. By comparing the effects of ethanol, acid and salt precipitation on the recovery of phycocyanin, the results showed that the recovery rate of phycocyanin was 97.10% and the purity of phycocyanin was the highest when 50% ammonium sulfate precipitation method was used. Phycocyanin was extracted by high-speed homogenization and recovered by 30% and 50% two-step salt precipitation. Under these conditions, 239.70 mg/g of phycocyanin with the purity over 0.7 could be obtained from each 1 g *Spirulina* powder. The UV spectra results showed that the extracted phycocyanin met with the spectral characteristics of the standard phycocyanin product.

Key words: *Spirulina platensis*; phycocyanin; extraction methods; recovery rate

螺旋藻是极易大规模工业化养殖的微藻之一^[1]。螺旋藻的蛋白含量占其干重 60% 左右, 其氨基酸种类齐全且对人体不产生任何急性、亚急性、慢性危害^[2]。藻胆蛋白是一组高度保守的色素蛋白, 它们构成了螺旋藻捕获光能的重要装置-藻胆体。常见的藻胆蛋白种类有别藻蓝蛋白、藻蓝蛋白和藻红蛋白^[3]。钝顶螺旋藻是现今国内外大规模养殖并用于商业化生产的螺旋藻物种^[4]。藻蓝蛋白是螺旋藻细胞中重要的光合作用天然蓝色素^[5], 可作为着色剂应用于食品、日化产品

收稿日期: 2019-01-09

基金项目: 广西创新驱动发展专项 (桂科 AA17204075)

作者简介: 沈向阳(1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 营养健康产品开发、质量标准制定

通讯作者: 刘小玲(1972-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 蛋白质功能与活性肽

和药品中^[6]。研究^[7]表明藻蓝蛋白具有提高人体免疫力, 促进动物血细胞再生等生物活性功能。此外, 藻蓝蛋白具有强烈的荧光性^[8], 在分子生物学、免疫学和细胞学等方面有广泛的应用前景^[9]。按藻蓝蛋白的纯度高低可将其分为不同等级。纯度 0.7 为食品级, 可作为天然蓝色素, 3.9 以上作为反应等级, 大于 4.0 作为分析等级^[10]。

从螺旋藻中提取藻蓝蛋白, 需将其细胞破碎, 使藻蓝蛋白充分释放到提取溶剂中, 再经过分离与回收, 获得一定纯度的藻蓝蛋白。螺旋藻细胞破碎方法通常可采用机械法和非机械法^[11]。机械法包括如: 超声波破碎法^[12]、珠磨法^[13]、高速剪切法和高压均质法等^[14]。非机械法中常用的有酶溶法^[15]、化学渗透法和反复冻融法。不同的细胞破碎方式的效果和效率差别较大, 反复冻融破碎的方法处理时间长, 能耗高; 化学渗透

法易产生污染,蛋白易变性,后期提取液中成分复杂,不利于纯化。高速匀浆是物料破碎的重要方法,高速旋转的刀片产生强大剪切力,引起破碎的物料与溶剂在高速流动中充分进行物质传递,加快可溶性物质的溶出。目前国内关于高速匀浆提取藻蓝蛋白的研究较少。俞剑锋^[16]等人采用超细剪切联合盐析法提取螺旋藻中的藻蓝蛋白,得率达12%。但其需要经过4 h以上的浸泡预处理,并且没有探究提取次数、提取温度、不同提取溶剂对藻蓝蛋白得率的影响。为此本研究基于高速匀浆法,探究溶剂及pH,提取溶剂量,提取温度、时间、次数对藻蓝蛋白得率的影响,并获得最佳提取条件,为藻蓝蛋白的工业化提供一条新方案。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

钝顶螺旋藻粉,广西农垦绿仙生物保健食品有限公司;藻蓝蛋白标品(Cas 11016-15-2, E25 藻蓝),纯度为2.3,浙江宾美生物科技有限公司。

Tris-HCl 缓冲液,北京索莱宝科技有限公司;无水乙醇、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠、硫酸铵、盐酸、氢氧化钠,国产分析纯试剂。

1.2 仪器与设备

高速分散机(ULTRA-TURRAX T 25 digital 型),德国 IKA 公司;层析柜(CXG-1 型),上海康华生化仪器制造有限公司;高速冷冻离心机(Eppendorf Centrifuge 5810 R 型),德国 Eppendorf 公司;冷冻干燥机(CHRIST Beta2-8LSCplus 型),德国 CHRIST 公司;紫外可见分光光度计(Mapada UV-6100 Double Beam Spectrophotometer 型),上海美谱达仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 溶剂及 pH 对螺旋藻藻蓝蛋白提取的影响

将螺旋藻 10 份各 10 g 分别加入到 0.1 mol/L 不同 pH 值(pH 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)的 PBS 或 Tris-HCl 缓冲溶液中于室温(25 ℃)下以 10000 r/min 匀浆 10 min,匀浆结束后,样液于 8000 r/min 离心 25 min,取清液测定藻蓝蛋白的含量,计算不同溶剂下藻蓝蛋白提取得率。

1.3.2 提取溶剂量对螺旋藻藻蓝蛋白提取的影响

将 10 g 螺旋藻分别加入 0.1 mol/L pH 7.0 PBS 缓

冲溶液中,使得提取溶剂量为 1:10、1:20、1:30 (g/mL)。以高速匀浆器 10000 r/min 于室温(25 ℃)下匀浆 10 min,匀浆结束后,样液于 8000 r/min 离心 25 min,取清液测定藻蓝蛋白的含量,计算藻蓝蛋白提取得率。

1.3.3 提取温度对螺旋藻藻蓝蛋白提取的影响

将螺旋藻 5 份各 10 g,分别加入 0.1 mol/L pH 7.0 PBS 缓冲溶液(总量为 200 mL),分别在 10、20、30、40、50 ℃下,以 10000 r/min 匀浆 10 min,处理结束后,样液于 8000 r/min 离心 25 min,取清液,测定藻蓝蛋白的含量,计算藻蓝蛋白提取得率。

1.3.4 提取时间对螺旋藻藻蓝蛋白提取的影响

将螺旋藻 5 份各 10 g,分别加入 200 mL 0.1 mol/L pH 7.0 PBS 缓冲溶液,以 10000 r/min 于 30 ℃下分别匀浆 10、20、30、40、50 min,匀浆结束后,样液于 8000 r/min 离心 25 min,取清液测定藻蓝蛋白的含量,计算藻蓝蛋白提取得率。

1.3.5 提取次数对螺旋藻藻蓝蛋白提取的影响

将 10 g 螺旋藻一次或分次加入 0.1 mol/L pH 7.0 PBS 缓冲溶液(总量为 200 mL),以高速匀浆器 10000 r/min 于 30 ℃匀浆 1 次/40 min/200 mL、2 次/20 min/100 mL、3 次/13.3 min/66.6 mL(次/每次时间/每次加入溶剂量),每次处理结束后,样液于 8000 r/min 离心 25 min,多次提取时合并上清液,取清液测定藻蓝蛋白的含量,计算藻蓝蛋白提取得率。

1.3.6 正交实验设计

在单因素试验基础上,选择提取时间、提取温度、提取溶剂量和提取次数,分别设计四因素三水平正交试验,每个试验重复 3 次,确定钝顶螺旋藻藻蓝蛋白提取的最佳工艺条件。

1.3.7 回收方式对螺旋藻藻蓝蛋白的影响

分别采取硫酸铵沉淀法、酸沉淀法、乙醇沉淀法处理螺旋藻提取澄清液,将处理后的沉淀物用 3000 U 透析袋于超纯水中透析 24 h。透析液冷冻干燥,得到粗提螺旋藻蛋白 C-PC。计算藻蓝蛋白的纯度和回收率 ζ 。

具体回收方法如下:

(1) 硫酸铵沉淀法:将硫酸铵加入螺旋藻提取澄清液中,搅拌使其饱和度逐步达到 30%,观察沉淀形成与颜色情况,于 4 ℃避光静置 12 h,于 8000 r/min 离心 25 min,回收沉淀物(S30-C-PC),上清液继续添加硫酸铵至饱和度达到 50%,重复以上操作,收集沉淀(S50-C-PC),再添加硫酸铵至饱和度为 70%,重复以上操作,收集沉淀(S70-C-PC)。

(2) 乙醇沉淀法:螺旋藻提取澄清液中,加入无水乙醇,使其浓度不断提高,直至乙醇浓度达 50%,

置于 4 ℃ 避光静置 12 h, 于 8000 r/min 离心 25 min, 回收沉淀物 (E50-C-PC), 上清液继续添加无水乙醇至 70% 乙醇浓度, 重复以上操作, 收集沉淀 (E70-C-PC), 再添加无水乙醇至 90% 浓度, 重复以上操作, 收集沉淀 (E90-C-PC)。

(3) 酸沉淀法: 螺旋藻提取澄清液中, 加入 0.1 mol/L 盐酸溶液, 使其 pH 不断下降, 直至有溶液浑浊 (pH 4.6), 置于 4 ℃ 避光静置 12 h, 于 8000 r/min 离心 25 min, 回收沉淀物 (A4.6-C-PC), 上清液继续添加盐酸溶液直至 pH 4.0, 重复以上操作, 收集沉淀 (A4.0-C-PC)。

1.3.8 藻蓝蛋白 (C-PC) 含量测定

准确称取纯度为 2.3 藻蓝蛋白 100.0 mg, 加入蒸馏水 100 mL 配置为 1 mg/mL 的藻蓝蛋白母液。分别将母液稀释为 0.00、0.04、0.05、0.10、0.20、0.25、0.40 mg/mL 的溶液, 移取适量于 620 nm 处测定标准溶液的吸光度 A_{620} , 建立浓度与吸光度的标准曲线, 经线性回归, 得到藻蓝蛋白的标准回归方程为:

$$y=2.8745x+0.0018 \quad (1)$$

式中: x-藻蓝蛋白质量浓度, mg/mL; y-样品溶液在 620 nm 处吸光度。

藻蓝蛋白浓度与 620 nm 处吸光值标准曲线 R^2 为 0.9999, 说明浓度在 0.00~0.40 mg/mL 时线性良好, 可以用来估算藻蓝蛋白的浓度。

将提取的藻蓝蛋白提取液直接或稀释 50 倍数后, 于分光光度计测定 620 nm 吸光度, 根据回归方程求算提取液中藻蓝蛋白含量 (C-PC)。

1.3.9 藻蓝蛋白得率计算

参考 Bennett^[17]公式稍加修改。

$$Y = \frac{C-PC \times V}{M} \quad (2)$$

式中: Y: 藻蓝蛋白提取得率, mg/g; C-PC: 提取液中藻蓝蛋白含量, mg/mL; V: 提取液体积, mL; M: 用于提取的螺旋藻质量, g。

1.3.10 藻蓝蛋白回收率及纯度 P 计算

藻蓝蛋白的纯度参考 Herrera 等^[18]的方法, 用其可见光区最大吸收峰 620 nm 处的吸光度与其在 280 nm 处的吸光度的比值表示。

$$P = \frac{A_{620}}{A_{280}} \quad (3)$$

式中: P: 藻蓝蛋白纯度; A_{620} : 620 nm 处吸光值; A_{280} : 280 nm 处吸光值。

分别测量 3 种回收方式处理前后的离心上清液溶液体积和藻蓝蛋白质量浓度 (依据式 1), 计算回收率, 分段沉淀时, 每段的回收率 ζ 表示为累积回收率。

1.3.11 钝顶螺旋藻中蛋白质含量及藻蓝蛋白含量

螺旋藻中蛋白质含量依据 GB/T 5009.5-2016 《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》中凯氏定氮法测量, 钝顶螺旋藻蛋白质含量 (占干基) 为 68.15%。依据 SN/T 1113-2002 《进出口螺旋藻中藻蓝蛋白、叶绿素含量的测定方法》对藻粉进行相同处理, 采用标准曲线法计算钝顶螺旋藻中藻蓝蛋白含量, 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白含量约为 215.00 mg/g。

1.3.12 实验处理与数据统计分析方法

实验数据的统计与分析以及作图采用 Origin Pro 9.0 和 SPSS 19.0 软件。对所有数据进行单因素方差分析, 每组实验重复三次, 同组字母之间不同表示差异显著 ($p < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 溶剂对螺旋藻藻蓝蛋白提取的影响

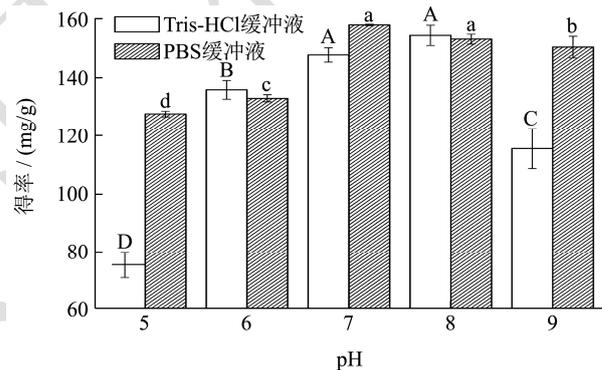


图 1 两种缓冲液 pH 值对藻蓝蛋白提取得率的影响

Fig.1 Effects of two pH buffer on extraction yield of C-phycoerythrin

注: 不同大写字母之间差异显著 ($p < 0.05$); 不同小写字母之间差异显著 ($p < 0.05$)。

如图 1 所示, 随着 Tris-HCl 缓冲液 pH 值的增大, 藻蓝蛋白的得率先增加后降低, 且在 pH 8.0 的条件下, 藻蓝蛋白得率最高, 为 154.33 mg/g, 与 pH 7.0 时藻蓝蛋白得率无显著性差异, 比其他 pH 条件下高 7%~106%。这可能是因为 Tris-HCl 在弱碱性条件下发挥作用更好。随着 PBS 缓冲液 pH 值的增加, 藻蓝蛋白的得率也呈先增加后降低的趋势, 且在 pH 7.0 的条件下, 藻蓝蛋白得率最高, 为 157.75 mg/g, 显著高于 pH 5.0 或 6.0 条件下的, 比其分别高 24% 和 18%。相同 pH 值条件下, PBS 缓冲液提取所得藻蓝蛋白得率均高于 Tris-HCl 缓冲液。Sofia 等^[19]研究表明, 使用缓冲液提取藻蓝蛋白, 藻蓝蛋白提取率显著高于用水或者是乙醇提取。本实验研究表明 pH 8.0 的 Tris-HCl

缓冲液也可适用于藻蓝蛋白的提取。Pan-utai 等^[20]研究了 0.10、0.01 mol/L 的 PBS 缓冲液对烘干和冻干钝顶螺旋藻藻蓝蛋白提取的影响, 结果表明 pH 为 7.0 的 0.1 mol/L 的 PBS 提取所得藻蓝蛋白浓度最高, 这与本实验研究结果相符合。然而作者并没有比较不同 pH 值对藻蓝蛋白提取的影响。本实验研究结果表明与同浓度的 Tris-HCl 缓冲液相比, PBS 更适合作为藻蓝蛋白的提取溶剂。这可能是由于 pH 对藻蓝蛋白影响较大, 中性条件下藻蓝蛋白活性最高。因此选取 pH 7.0 的 PBS 缓冲液为提取溶剂。

2.2 提取溶剂量对螺旋藻藻蓝蛋白提取的影响

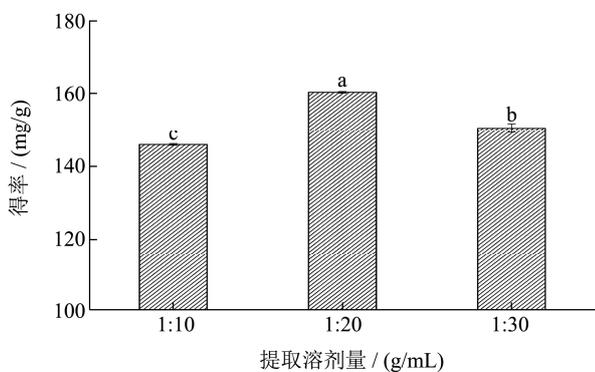


图 2 提取溶剂量对藻蓝蛋白提取得率的影响

Fig.2 Effects of Solid-liquid ratio on extraction yield of C-phycoerythrin

注: 不同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。图 3~5 同。

如图 2 所示, 当提取溶剂量为 1:20 (g/mL), 藻蓝蛋白提取得率最高, 为 160.36 mg/g, 显著高于 1:10, 1:30 (g/mL) 两组。这是由于提取溶剂量影响藻粉在溶剂中的分散程度, 藻粉的分散性越高, 藻蓝蛋白越容易溶出; 此外, 高速匀浆法提取过程中周围的能量增大可能导致藻细胞壁的破坏, 藻蓝蛋白浓度梯度对细胞壁的损伤可提高提取率。故选取提取溶剂量 1:20 (g/mL)。

2.3 提取温度对螺旋藻藻蓝蛋白提取的影响

如图 3 所示, 提取溶剂量为 1:20 (g/mL) 时, 提取次数 1 次, 提取时间 10 min, 随着提取温度的增加, 藻蓝蛋白得率呈先升高后降低的趋势。提取温度为 30 °C 时, 藻蓝蛋白得率最高, 为 157.27 mg/g, 显著高于其他温度下藻蓝蛋白得率, 比其高 4%~15%。这可能是低温环境下, 不利于藻蓝蛋白的溶出, 而高温易造成藻蓝蛋白变性, 从而降低了提取得率。Mittal 等^[21]研究了不同温度对超声波提取大型藻类红藻中

的藻蓝蛋白的影响, 结果表明, 30 °C 下可提取出藻蓝蛋白 0.03 mg/g 的最大产率。然而采用超声波处理法易产生高温造成藻蓝蛋白变性。相反, Hadiyanto 等^[22]的研究结果表明, 提取藻蓝蛋白在 45 °C 条件下得率最高。然而提取过程中所需温度越高, 能耗也越大。本实验结果表明高速匀浆法最适温度为 30 °C。因此, 本实验选用的提取温度为 30 °C。

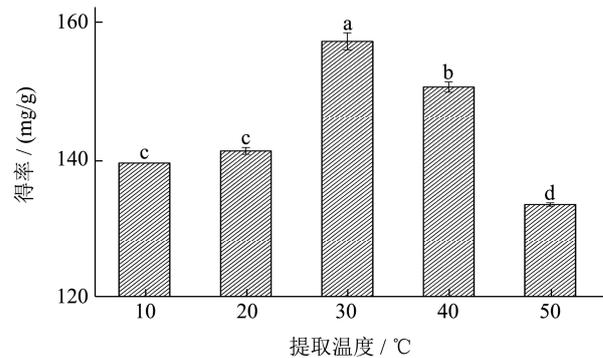


图 3 提取温度对藻蓝蛋白提取得率的影响

Fig.3 Effect of temperature on extraction yield of C-phycoerythrin

2.4 提取时间对螺旋藻藻蓝蛋白提取的影响

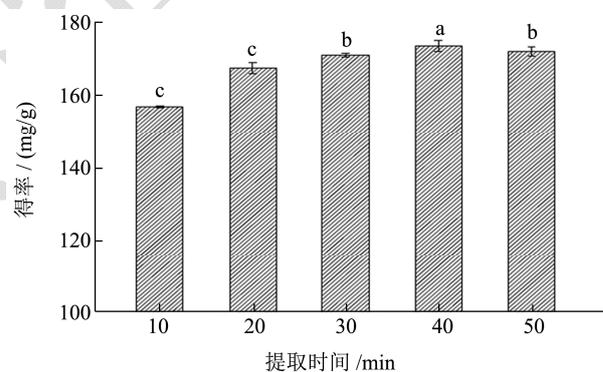


图 4 提取时间对藻蓝蛋白提取得率的影响

Fig.4 Effects of extraction time on extraction yield of C-phycoerythrin

如图 4 所示, 随着提取时间的延长, 藻蓝蛋白得率呈上升趋势。在提取溶剂量为 1:20 (g/mL) 的条件下, 提取时间为 40 min 时藻蓝蛋白得率最高, 为 173.19 mg/g, 显著高于提取时间 10、20 min 的, 分别高 10% 和 4%。这说明延长提取时间可以增大螺旋藻藻蓝蛋白释放到溶剂中的程度, 从而增加藻蓝蛋白提取得率。然而在提取时间为 50 min 时藻蓝蛋白得率下降, 这可能是由于高速匀浆处理会产生巨大剪切力, 长时间剪切易造成藻蓝蛋白起泡和仪器发热, 可能引起藻蓝蛋白变性, 造成藻蓝蛋白得率损失。Morales 等^[23]研究表明, 提取时间 0~60 min 内提取效果最佳, 超过 60 min, 藻蓝蛋白得率增加不变。而本实验结果表明高速匀浆

法 40 min 即可大量提取螺旋藻中的藻蓝蛋白, 继续增加提取时间, 藻蓝蛋白得率降低。因此选择提取时间 40 min。

2.5 提取次数对螺旋藻藻蓝蛋白提取的影响

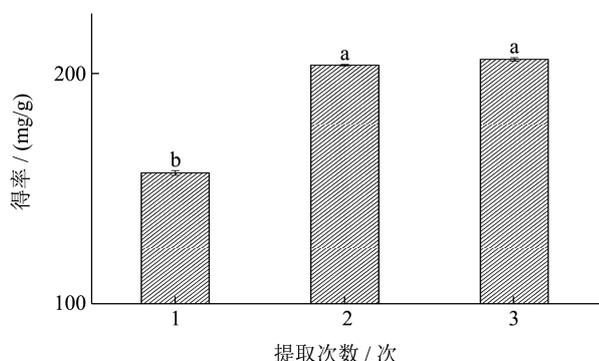


图 5 提取次数对藻蓝蛋白提取得率的影响

Fig.5 Effect of extraction times on extraction yield of C-phycocyanin

图 5 为提取次数对藻蓝蛋白得率的影响。当提取次数为 2 次数, 藻蓝蛋白得率显著高于 1 次提取, 比其高 29%, 这可能是由于螺旋藻细胞壁较厚, 一次提取并不能完全将藻细胞内的藻蓝蛋白释放出来。继续

增加提取次数, 藻蓝蛋白得率不再变化。这可能是由于 2 次提取藻细胞破碎率达较大值, 藻蓝蛋白释放较完全。吴蕾等^[24]研究表明, 高压匀浆 3 次所得藻蓝蛋白含量达最大值, 继续增加提取次数, 藻细胞破碎率和藻蓝蛋白浓度变化不大。本研究结果表明采用高速匀浆法处理, 提取 2 次, 藻蓝蛋白即可从藻细胞中大量释放出来, 且与高压匀浆相比, 设备简单, 成本低。故选取提取次数 2 次。

2.6 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白提取条件优化

在单因素实验的基础上, 每个因素取 3 个水平(表 1), 以藻蓝蛋白得率为评价指标, 设计正交实验来优化钝顶螺旋藻藻蓝蛋白的提取工艺, 结果见表 2。

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels used in orthogonal experiment

水平	A 提取时间/min	B 提取温度/°C	C 提取溶剂量/(g/mL)	D 提取次数
1	30	20	1:10	1
2	40	30	1:20	2
3	50	40	1:30	3

表 2 正交实验结果

Table 2 Results of orthogonal experimental

试验号	A	B	C	D	藻蓝蛋白得率/(mg/g)
1	1	1	1	1	155.05±1.00
2	1	2	2	2	205.22±0.11
3	1	3	3	3	203.24±0.02
4	2	1	2	3	206.75±0.38
5	2	2	3	1	167.98±0.57
6	2	3	1	2	200.55±0.28
7	3	1	3	2	160.10±0.15
8	3	2	1	3	187.72±0.37
9	3	3	2	1	150.65±0.33
K ₁	187.84	173.97	181.11	157.89	
K ₂	191.76	186.97	187.54	188.62	
K ₃	166.16	184.81	177.11	199.24	
R	25.60	13.00	10.43	41.35	
因素主次	DABC				
优方案	D ₃ A ₂ B ₂ C ₂				

由表 2 分析可知, 4 个因素对钝顶螺旋藻藻蓝蛋白得率的影响顺序为提取次数>提取时间>提取温度>提取溶剂量, 最佳提取工艺条件为提取时间 40 min, 提取温度 30 °C, 提取溶剂量 1:20 (g/mL), 提取次数 3 次。在此条件下重复 3 次提取, 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白得率为 213.32 mg/g。熊勇^[25]等人研究藻蓝蛋白的浸

提工艺, 即提取温度 18.97 °C, 提取溶液浓度为 1.54%, 提取时间为 6.72 h, 在此条件下提取效果最好。然而该工艺提取效率低, 原材料利用不充分。俞剑峰^[11]等人研究细胞破壁对藻蓝蛋白提取效果影响, 结果表明溶胀-超细剪切法最佳的提取工艺为: 溶胀时间 12 h, 剪切时间 5 min。然而该工艺还需要经过浸泡预

处理,耗时长。采用本实验工艺,操作简便可行,耗时短,藻蓝蛋白得率高。

2.7 回收方式对螺旋藻藻蓝蛋白的影响

表3为不同回收方式所得螺旋藻藻蓝蛋白的纯度和回收率。结果表明,50%硫酸铵沉淀法处理所得藻蓝蛋白的纯度最高,为1.04,藻蓝蛋白回收率达97.10%。这是由于高浓度的盐离子在蛋白溶液中可与藻蓝蛋白竞争水分子,破坏其表面的水化膜,降低其溶解度,使之从溶液中沉淀出来。俞剑锋等^[16]研究表明,当硫酸铵饱和度小于50%时,藻蓝蛋白得率逐渐增加,当硫酸铵饱和度大于50%时藻蓝蛋白得率开始降低,这与本试验结果相一致。Sofia^[19]研究表明,乙醇回收藻蓝蛋白具有可持续性。然而50%的乙醇沉淀藻蓝蛋白的纯度并未提升,证明乙醇可以沉淀溶液中的大分子物质但对藻蓝蛋白与其他杂蛋白或杂质的分离(多糖、核酸)不具有选择性。本实验结果表明,硫酸铵沉淀法效果优于乙醇沉淀法和酸沉淀法。李思梦^[26]等研究表明当硫酸铵饱和度大于50%时,藻蓝蛋白纯度达到0.7,达到食品级要求。然而本实验研究表明使用30%的硫酸铵盐析所得藻蓝蛋白纯度即达到0.7。进一步采用50%硫酸铵盐析,纯度可达1.0以上。因此本试验采用两步盐析法沉淀处理螺旋藻提取液。经过透析除盐冻干后称量,可得到纯度0.7以上的色素级藻蓝蛋白共239.7 mg/g干粉。

表3 回收方式对螺旋藻藻蓝蛋白纯度和回收率的影响

Table 3 Effects of recovery methods on the purity and recovery rate of *Spirulina phycocyanin*

回收物	纯度 P	回收率 ζ %
S30-CPC	0.83±0.01	56.9±0.63
S50-CPC	1.04±0.03	97.1±0.02
S70-CPC	1.04±0.02	99.3±0.01
A4.6-CPC	0.32±0.02	21.5±1.81
A4.0-CPC	0.45±0.03	60.7±0.23
E50-CPC	0.36±0.02	100±0.01
E70-CPC	0.36±0.02	100±0.01
E90-CPC	0.36±0.01	100±0.01

2.8 藻蓝蛋白紫外-可见扫描图谱

图6为藻蓝蛋白标品和50%硫酸铵沉淀所得藻蓝蛋白纯度1.0的紫外-可见光谱扫描曲线。由图6可得,藻蓝蛋白标品有3个最大吸收峰,分别在620、392、280 nm处。50%硫酸铵沉淀物在280、395、620 nm左右均有吸收峰,且无其他吸收峰,证明提取物主要成分为藻蓝蛋白。Zhang等^[27]通过对将纯化过程中各

阶段得到的藻蓝蛋白溶液和杂质液进行紫外-可见光谱扫描,发现随着纯化过程的进行,在250~300 nm吸收谱带中,吸收峰从260 nm红移至280 nm;在500~700 nm吸收谱带中,吸收峰从617 nm红移至620 nm,并表现为最大特征吸收峰。汪家权等^[28]探究了6步盐析纯化藻蓝蛋白,结果表明较高摩尔浓度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的二步盐析可以大量去除核酸维生素等杂质,使得藻蓝蛋白的纯度有较大幅度上升,藻蓝蛋白的回收率也保持在90%以上,与本试验结果一致。本研究表明,采用30%和50%两步盐析方法操作步骤少,藻蓝蛋白回收率和得率均较高。

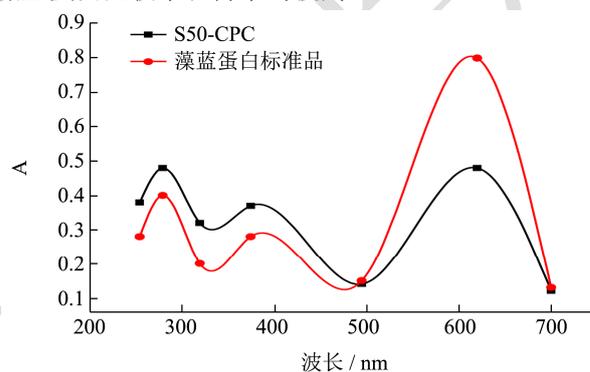


图6 紫外-可见光谱扫描曲线

Fig.6 UV-Vis spectra of phycobiliprotein purified by stepwise salting-out

注: S50-CPC 为 50%硫酸铵盐析所得沉淀物。

3 结论

经工艺优化得,钝顶螺旋藻加入20倍, pH 7.0的PBS缓冲液,控制温度为30℃,经10000 r/min高速匀浆,分3次合计40 min的匀浆处理后,可从钝顶螺旋藻中获得藻蓝蛋白,其得率为213.32 mg/g。采用本工艺可充分释放藻粉中的藻蓝蛋白,并且耗时短,易操作。采用两步盐析法回收藻蓝蛋白,回收率较高且纯度较高。经透析干燥,从螺旋藻中获得纯度0.7以上的藻蓝蛋白239.70 mg/g干粉,其纯度达到色素级藻蓝蛋白的要求。本方法操作简单,可为藻蓝蛋白的工业化制备提供参考。然而,本实验并未对乙醇沉淀法做更深入的研究,可采取梯度醇沉法提高藻蓝蛋白纯度,从而更有利于溶剂的脱除。

参考文献

- [1] Thengodkar R R M, Sivakami S. Degradation of chlorpyrifos by an alkaline phosphatase from the cyanobacterium *Spirulina platensis* [J]. Biodegradation, 2010, 21(4): 637-644
- [2] Gutierrez-Salmean G, Fabila-Castillo L, Chamorro-Cevallos G. Nutritional and toxicological aspects of *Spirulina*

- (*Arthrospira*) [J]. *Nutricion Hospitalaria*, 2015, 32(1): 34-40
- [3] Romay Ch, González R, Ledón N, et al. C-Phycocyanin: A biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects [J]. *Current Protein and Peptide Science*, 2003, 4(3): 207-221
- [4] Juárez-Oropeza M A, Mascher D, Torres-Durán P V, et al. Effects of dietary spirulina on vascular reactivity [J]. *Journal of Medicinal Food*, 2009, 12(1): 15-20
- [5] 刘铭简,潘言明.国内外螺旋藻的生产与应用概况[J].*农业环境与发展*,1990,3:25-28
LIU Ming-jian, PAN Yan-ming. Production and application of *Spirulina* at home and abroad [J]. *Journal of Agricultural Environment and Development*, 1990, 3: 25-28
- [6] Sekar S, Chandramohan M. Phycobiliproteins as a commodity: Trends in applied research, patents and commercialization [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2008, 20(2): 113-136
- [7] Baudelet P, Gagez A, Bérard J, et al. Antiproliferative activity of cyanophora paradoxa pigments in melanoma, breast and lung cancer cells [J]. *Marine Drugs*, 2013, 11(11): 4390-4406
- [8] Van den Driessche J J, Plat J, Mensink R P. Effects of superfoods on risk factors of metabolic syndrome: A systematic review of human intervention trials [J]. *Food & Function*, 2018, 9(4): 1944-1966
- [9] Roy K R, Arunasree K M, Reddy N P, et al. Alteration of mitochondrial membrane potential by spirulina platensis c-phycocyanin induces apoptosis in the doxorubicinresistant Human hepatocellular-carcinoma cell line HepG2 [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2007, 47(3): 159
- [10] Patil G, Chethana S, Sridevi A S, et al. Method to obtain C-phycocyanin of high purity [J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1127(1-2): 76-81
- [11] 俞建峰,傅剑,马潇,等.细胞破壁对螺旋藻藻蓝蛋白提取效果的影响[J].*食品与机械*,2017,5:173-177
YU Jian-feng, FU Jian, MA Xiao, et al. Effect of cell wall breaking on the extraction of phycocyanin from spirulina platensis [J]. *Food and Machinery*, 2017, 5: 173-177
- [12] LIU Cheng, CAO Zhen, HE Si-yuan, et al. The effects and mechanism of phycocyanin removal from water by high-frequency ultrasound treatment [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2018, 41: 303-309
- [13] Jana Geciova, Dean Bury2, Paul Jelen. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry-a review [J]. *International Dairy Journal*, 2002, 12: 541-553
- [14] 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*,2008,4:461-463
WU Lei, PANG Guang-chang, CHEN Qing-sen. Research progress in extraction and chromatographic purification of phycocyanin from spirulina platensis [J]. *Journal of Food Science*, 2008, 4: 461-463
- [15] 付尽国,班甲,李浩洋,等.酶法辅助超高压均质技术提取裂殖壶菌油脂[J].*食品科技*,2017,42(4):16-20
FU Jin-guo, BAN Jia, LI Hao-yang, et al. Lipid extraction from *Schizochytrium* sp. by enzyme assisted with ultra-high pressure homogenization [J]. *Food Science and Technology*, 2017, 42(4): 16-20
- [16] 俞建峰,傅剑,马潇,等.基于超细剪切细胞破壁技术的藻蓝蛋白提取工艺[J].*食品与生物技术学报*,2017,10:1071-1076
YU Jian-feng, FU Jian, MA Xiao, et al. Extraction process of phycocyanin based on ultrafine shear cell wall breaking technology [J]. *Journal of Food and Biotechnology*, 2017, 10: 1071-1076
- [17] Bennett A, Bogorad L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1973, 58(2): 419-435
- [18] A Herrera, S Boussiba, V Napoleone, et al. Recovery of C-phycocyanin from the *Cyanobacterium spirulina* Maxima [J]. *Journal of Applied Phycology*, 1989, 1(4): 325-331
- [19] Papadaki S, Kyriakopoulou K, Tzovenis I, et al. Environmental impact of phycocyanin recovery from *Spirulina platensis* cyanobacterium [J]. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* 2017, 44: 217-223
- [20] Pan-Utai W, Kahapana W, Iamtham S. Extraction of C-phycocyanin from *Arthrospira* (*Spirulina*) and its thermal stability with citric acid [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2018, 30(1): 231-242
- [21] Mittal R, Tavanandi H A, Mantri V A, et al. Ultrasound assisted methods for enhanced extraction of phycobiliproteins from marine macro-algae, *Gelidium pusillum* (*Rhodophyta*) [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2017, 38: 92-103
- [22] Hadiyanto, Sutrisnorhadi, Sutanto H, et al. The effects of temperature and frequencies in ultrasound assisted extraction of phycocyanin from microalgae *Spirulina* [C]// International Conference of Chemical & Material Engineering. AIP Publishing LLC, 2015
(下转第 136 页)