

螺旋藻蛋白制备技术研究

巩东辉^{1,2*}, 王志忠^{2,3}, 王志国²

¹内蒙古科技大学生命科学与技术学院, 内蒙古 包头

²鄂尔多斯市琢成生物科技有限责任公司, 内蒙古 鄂尔多斯

³鄂尔多斯生态环境职业学院, 内蒙古 鄂尔多斯

收稿日期: 2022年7月16日; 录用日期: 2022年8月15日; 发布日期: 2022年8月24日

摘要

为研究鄂尔多斯螺旋藻可溶性蛋白提取工艺的最佳条件, 本实验以鄂尔多斯螺旋藻藻粉为原料, 通过反复冻融法、超声波破碎法、以及反复冻融联合超声波破碎法来提取蛋白质过程中的各因素对其产品含量和产品纯度的影响, 通过试验确定最佳提取条件。结果表明: 采用蒸馏水为提取液时, 在反复冻融4次联合超声波破碎4次, 固液比例为1:30下可溶性蛋白溶出率达到25.52%; 比单个破碎方法有明显的优势, 在此条件下实验经过硫酸铵梯度盐析沉淀可溶性蛋白, 结果显示在50%的硫酸铵盐析条件下蛋白含量最高。

关键词

螺旋藻, 总蛋白, 提取

Study on the Preparation Technology of Spirulina Proteinpolysaccharide and Polypeptide

Donghui Gong^{1,2*}, Zhizhong Wang^{2,3}, Zhiguo Wang²

¹School of Life Science and Technology, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou Inner Mongolia

²Ordos Zhuocheng Biotechnology Co., Ltd., Ordos Inner Mongolia

³Ordos Vocational College of Eco-Environment, Ordos Inner Mongolia

Received: Jul. 16th, 2022; accepted: Aug. 15th, 2022; published: Aug. 24th, 2022

*通讯作者。

Abstract

In order to study the best extraction conditions of soluble protein from Erdos Spirulina, this experiment used Erdos Spirulina powder as raw material to extract protein by repeated freeze-thaw method, ultrasonic crushing method and repeated freeze-thaw combined with ultrasonic crushing method. The optimum extraction conditions were determined by experiments. The results showed that when distilled water was used as the extraction solution, the dissolution rate of soluble protein was 25.52% under the condition of repeated freeze-thaw for 4 times and ultrasonic crushing for 4 times, and the solid-liquid ratio was 1:30; Under this condition, the soluble protein was precipitated by ammonium sulfate gradient salting out. The results showed that the protein content was the highest under the condition of 50% ammonium sulfate salting out.

Keywords

Spirulina, Total Protein, Extraction

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 绪论

螺旋藻蛋白质含量丰富,可占到螺旋藻干重的60%~70%,且其中有着占干重20%的活性藻胆蛋白。细胞破壁是螺旋藻藻蓝蛋白提取的关键步骤。采用酶破壁法、冻融破壁法、化学药品破壁法、胶膜破壁法对螺旋藻进行破壁处理。鄂尔多斯地区有着国内60%的螺旋藻初级产品,亟需开展深加工延伸产业链增加附加值,分离蛋白将提升螺旋藻的利用价值。现阶段拥有种类繁多的蛋白提取方法,但是到目前为止还是没有提出成熟稳定的提取方法,仍处在研究创新阶段[1]。细胞破壁以及分离纯化是提取蛋白必需关键技术[2]。传统的细胞破壁技术有高压均质[3]、超声波[4]、胶体磨[5]等方法。

本文以螺旋藻为研究对象,通过螺旋藻破壁技术研究,采用酶解[6]、超微粉碎[7]、气爆、溶胀[8]、超声、冻融[9]等手段对螺旋藻进行破壁,评价破壁效果并综合分析获得效率最高的破壁方法。开展螺旋藻蛋白提取工艺的研究,通过采用化学沉淀等技术实现螺旋藻蛋白的高纯度。

2. 材料与方法

2.1. 凯式定氮法测量总蛋白含量

2.1.1. 实验试剂、材料和器材

实验材料:螺旋藻粉

实验试剂:浓硫酸、30%氢氧化钠溶液、克氏催化剂、2%硼酸、指示剂、0.01 mL HCl。实验器材:凯氏烧瓶、电炉、凯氏定氮蒸馏装置、锥形瓶、100 mL容量瓶、酸式滴定管。

2.1.2. 实验方法

1) 消化

准确称取1克藻粉,用称量纸卷好小心送入至500毫升锥形瓶,向另一锥形瓶中加入20 ml水作空白对照;在每个锥形瓶内加入定量硫酸钾-硫酸铜混合物(克氏催化剂),浓硫酸20 ml,加入小瓷片数粒

并摇匀；并在每个瓶口放一小漏斗，在通风厨内的电炉上消化；待瓶内水汽蒸完，硫酸开始分解并放出 SO_2 白烟后，适当加强火力，继续消化，直至消化液呈透明绿色为止；等消化完毕，待烧瓶内容物冷却后，加 10 mL 蒸馏水，并在冷却后将瓶中内容物转入 100 mL 的容量瓶中，并用蒸馏水清洗瓶数次，溶液一并倒入容量瓶，最后定容至刻度摇匀备用。

2) 蒸馏

先洗净器皿后取 3 个 50 mL 的锥形瓶，分别加入 10 mL 硼酸(内加有混合指示剂)备用。用移液管吸取 2 mL 消化液，取一个盛有硼酸的锥形瓶，置于液管下，使管口恰好接触硼酸溶液，加入 30% 氢氧化钠 5 mL，随即夹紧，并往漏斗加入少量蒸馏水封闭。后利用凯氏定氮仪开始蒸馏，待第一滴蒸馏液从冷凝柱顶端滴下时起，继续蒸馏，然后将锥形瓶放低，使导管离开液面，最后用蒸馏水洗导管外壁，蒸馏完毕，取下锥形瓶准备滴定。

3) 滴定

蒸馏完毕后，用微量酸式滴定管，以 0.01 mol/L 盐酸标准溶液进行滴定锥形瓶内溶液，溶液由蓝绿色变为淡紫色或灰色，即为终点，并且记录所用盐酸的量，计算蛋白含量。

2.2. 螺旋藻可溶性蛋白最佳溶出率比较

本实验采用比较反复冻融法、超声波法、反复冻融法联合超声波破碎法获得最佳破碎方法。

2.2.1. 实验设备

高速离心机、冷冻冰箱、高速混合器、天平、分光光度计、超声波破碎仪。

2.2.2. 实验材料

鄂尔多斯螺旋藻粉、蒸馏水、考马斯亮蓝、硫酸铵。

2.2.3. 实验方法

1) 螺旋藻细胞破碎方法的比较

按照一定比例称取螺旋藻粉用蒸馏水充分溶解，利用反复冻融法、超声波破碎法、反复冻融法联合超声波破壁法。将溶液利用超声波破壁，再在 -20°C 下冰冻， 37°C 解冻，反复几次，至少 5 次冻融。用超声波破碎法破壁数次，时间 12 min，将两种细胞液放在显微镜下观察细胞破碎程度，并利用标准曲线在吸光度 A_{595} 下测出蛋白浓度，计算蛋白溶出率。

2) 蛋白质标准曲线的制作

试剂：标准蛋白质溶液、考马斯亮试剂

实验仪器和设备：分光光度计，离心机，研钵，烧杯，量瓶，移液管，试管等。

制作方法：取 6 支试管，按照 0、25、125、250、500、750、1000ug 配制标准蛋白溶液并摇匀，向各管中加入考马斯亮蓝试剂，以 0 号试管为空白对照，测定吸光度，以蛋白质含量为横坐标，以吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

2.3. 螺旋藻可溶性蛋白制备方案

螺旋藻蛋白制备工艺主要有破壁、分离、盐析、干燥等过程。

2.4. 可溶性蛋白最佳提取条件

实验用最佳破壁方法来继续提取可溶性蛋白，并在冻融次数、超声波次数、固液比等条件确定后利用硫酸铵沉淀提取最佳的可溶性蛋白含量。

实验材料：鄂尔多斯螺旋藻粉、蒸馏水、考马斯亮蓝试剂
 实验仪器：冷冻冰柜，恒温水浴锅、高速离心机、分光光度计

螺旋藻可溶性蛋白分离纯化

利用盐析沉淀法。

1) 可溶性蛋白硫酸铵梯度盐析的确定

制取可溶性蛋白粗提液，加入 10%，20% 以及到 80% 梯度饱和硫酸铵溶液进行盐析实验，在饱和硫酸铵溶液梯度盐析 10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80% 的情况下。在冷冻柜 4℃ 温度下静置 4 h，4000 r/min 离心 30 min，取上清液测定蛋白浓度，得出最佳盐析条件。

2) 可溶性蛋白盐析沉淀

取 2 g 螺旋藻粉混匀于 60 mL 蒸馏水，进行一个预实验来确定蛋白质浓度、pH、冻融次数、和提取次数，经过反复冻融法破碎细胞，经过 4℃，10,000 rpm/min，20 min 下离心，用硫酸铵沉淀蛋白，透析去除硫酸铵，测定蛋白含量。

3. 数据分析

3.1. 凯式定氮法测量总蛋白含量结果

实验结果

经过凯式定氮法测量螺旋藻总蛋白含量，经过 3 次的平行实验，滴定样品用去盐酸平均 8.58 mL，滴定空白用去的盐酸平均 1.44 mL，最终得出螺旋藻总蛋白含量为 62.50%。

3.2. 不同破壁技术对可溶性蛋白溶出率的影响

3.2.1. 不同破壁技术下细胞破碎效果比较

如图 1 所示，经过反复冻融、超声波破碎、冻融联合超声波破碎等不同破壁方法的比较，反复冻融联合超声波破碎方法破碎效果最好，细胞破碎达到 90% 以上，其他两种方法也均有良好的破壁效果。

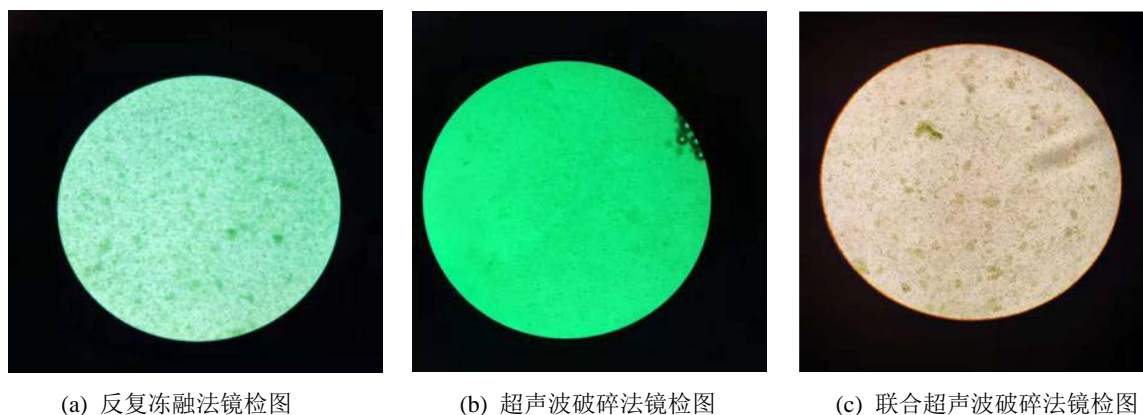


Figure 1. Microscopical pictures for different wall-breaking methods

图 1. 不同破壁方法镜检图

3.2.2. 蛋白质标准曲线

蛋白质标准曲线如图 2 所示。标准曲线方程为 $y = 0.0009x + 0.0007$ ， $R^2 = 0.9938$ 。

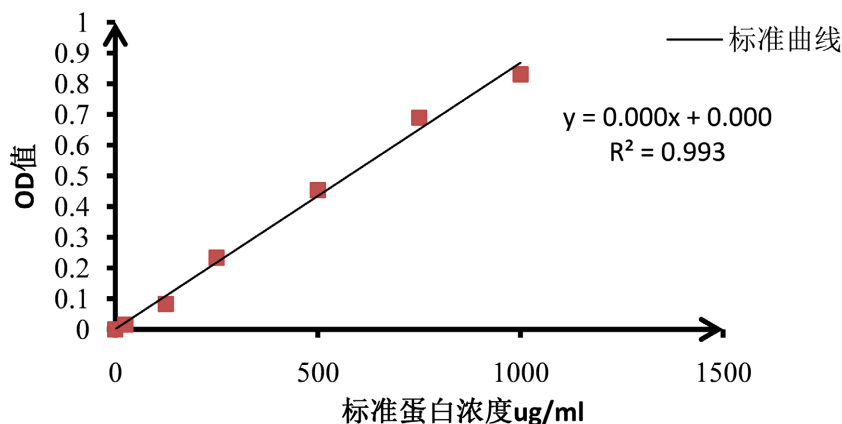


Figure 2. Protein standard curve
图 2. 蛋白质标准曲线

3.2.3. 反复冻融法溶出可溶性蛋白的影响

如图 3、图 4 所示，随着冻融次数的增加，可溶性蛋白浓度及溶出率先下降后上升的趋势，并且在冻融 4 次的条件下蛋白质溶出率最高，明显优于其他条件，为 15.51%。冻融 1 次与冻融 2 次时蛋白溶出率为 13.05%、13.42%，无较大变化，这是因为两次冻融次数相对较少，从而引起冰晶形成较少，未能充分破坏细胞壁是可溶性蛋白溶出，冻融 3 次条件下蛋白溶出率为 14.28%，蛋白溶出率相对提高，可以看出在一定的固液比，冻融时间相同的情况下随着冻融次数的增加，蛋白溶出率也明显增加，在冻融 5 次时蛋白溶出率最少，为 13.03%，所以反复冻融 4 次为最佳破壁条件。

3.2.4. 超声波破碎法溶出可溶性蛋白的影响

如图 5、图 6 所示，在一定的固液比，超声时间的情况下，随着依次增加超声次数，可溶性蛋白质浓度及蛋白溶出率有依次上升趋势，并且在超声 4 次，时间为 48 min 的条件下，破壁效果最好，可溶性蛋白溶出率最大，达到了 15.24%，超声波破碎 1 次跟 2 次时蛋白溶出率较少，达到 12.86%、14.16%，其原因是较少的超声次数未能充分破碎细胞使蛋白质溶出，超声 3 次时蛋白溶出率有明显的提高，直到超声 4 次时到达最好条件。

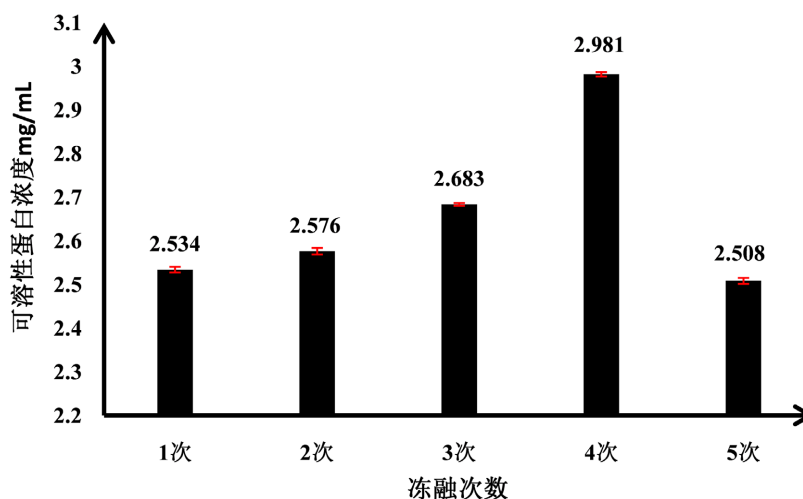


Figure 3. The concentration of soluble protein at different freeze-thaw crushing times
图 3. 不同冻融破壁次数下可溶性蛋白浓度

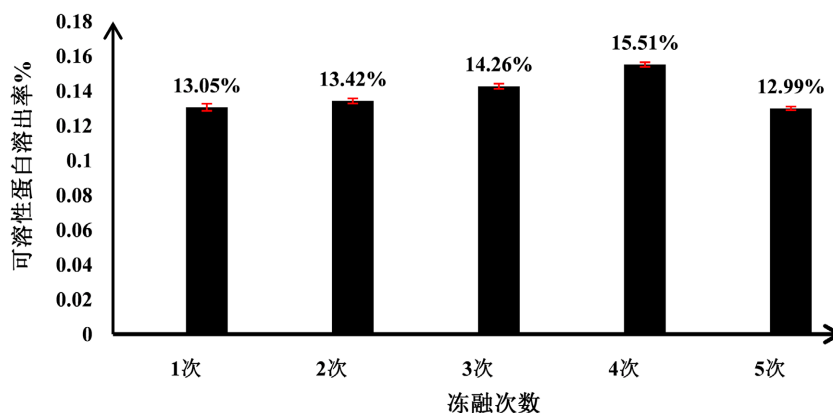


Figure 4. The dissolution rate of soluble protein at different freeze-thaw crushing times
图 4. 不同冻融破壁次数下可溶性蛋白溶出率

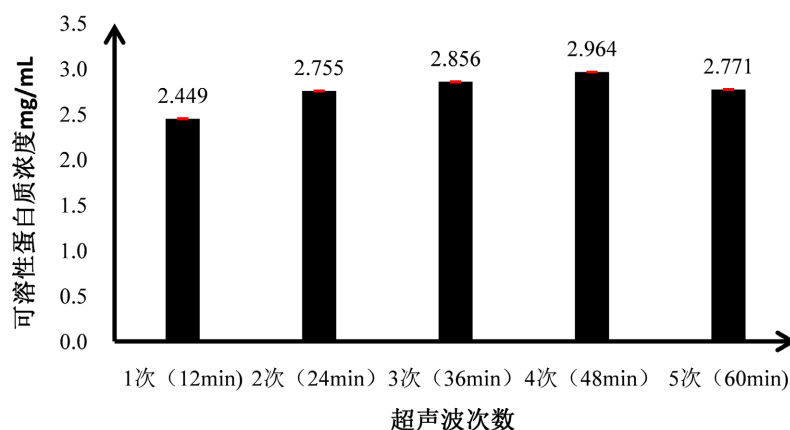


Figure 5. The concentration of soluble protein at different ultrasonic crushing times
图 5. 不同超声波破壁次数下可溶性蛋白浓度

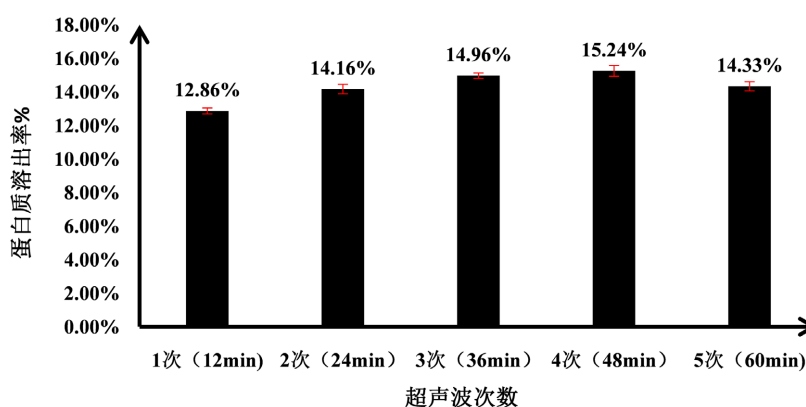


Figure 6. The dissolution rate of soluble protein at different ultrasonic crushing times
图 6. 不同超声波破壁次数下可溶性蛋白溶出率

3.2.5. 反复冻融法联合超声波破碎法溶出可溶性蛋白的影响

如图 7、图 8 所示，在分别得出反复冻融法和超声波破壁法最佳的破壁条件后，利用反复冻融法联合超声波破壁法得出最佳蛋白浓度以及溶出率条件对比，最终蛋白溶出效果明显优于反复冻融法和超声波破碎法，随着联合破壁次数的依次增加可溶性蛋白的浓度及溶出率有先增加后下降的趋势，且在联合

破壁 4 次的条件下蛋白浓度及蛋白溶出率最佳, 达到 25.56% 的蛋白溶出率, 在联合破壁 1 次、2 次条件下蛋白溶出率分别为 16.07%、16.43%, 并无明显变化, 浓度较低且溶出率较少, 但是对比反复冻融法跟超声波破碎法有很明显的蛋白溶出率的提高, 在联合破壁 3 次时溶出率达到 21.43%, 溶出率相对提高, 所以本次实验最终选用反复冻融联合超声波破碎方法来继续做可溶性蛋白分离纯化试验。

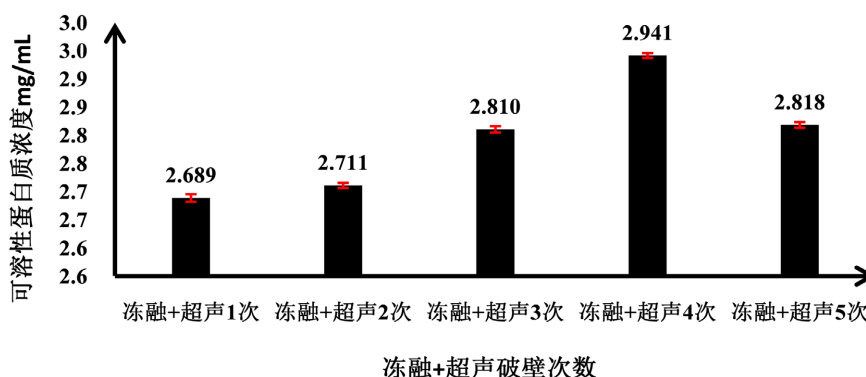


Figure 7. The concentration of soluble protein at different freeze-thaw and ultrasonic crushing times
图 7. 在反复冻融联合超声波破碎可溶性蛋白浓度

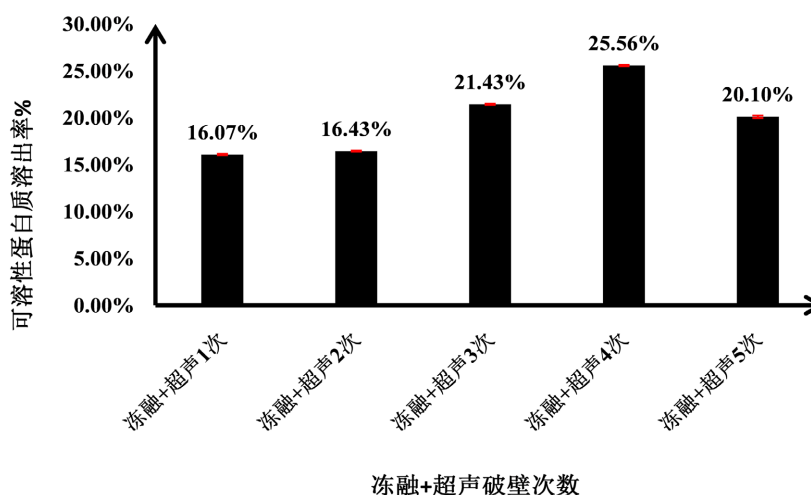


Figure 8. The dissolution rate of soluble protein at different freeze-thaw and ultrasonic crushing times
图 8. 在反复冻融联合超声波破碎可溶性蛋白溶出率

3.2.6. 联合破壁法在不同固液比例下溶出可溶性蛋白的影响

如图 9 所示, 在得出反复冻融法联合超声波破壁法最佳的破壁条件后, 以此条件来在不同固液比溶液上来得出最佳的固液比溶出率条件, 随着固液比例的增加可溶性蛋白的溶出率有先增加后下降的趋势, 且在固液比 1:30 的条件下蛋白溶出率最佳, 达到 25.52%, 在固液比 1:35、1:40 的条件下蛋白溶出率为 16.44%、16.07%, 并无明显变化, 且溶出率较少, 在固液比例 1:20、1:25 时蛋白溶出率为 20.09%、20.42%, 所以在固液比例 1:30 情况下蛋白浓度及溶出率达到最高。

3.3. 螺旋藻可溶性蛋白分离纯化

可溶性蛋白最佳盐析条件确定

如图 10、图 11、图 12 所示, 随着可溶性蛋白盐析比例的增加, 离心上清液中的蛋白含量逐步增加,

在盐析 30%时蛋白含量最高，这反而说明离心沉淀中蛋白含量最少，随着上清液蛋白浓度逐步减少，在盐析 60%是上清蛋白含量最低，说明沉淀中蛋白含量最高。

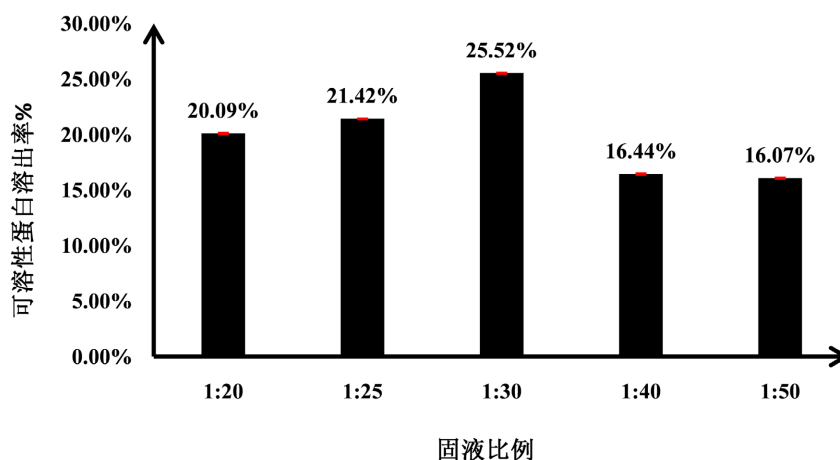


Figure 9. The dissolution rate of soluble protein at different solid-liquid ratios

图 9. 不同固液比可溶性蛋白溶出率

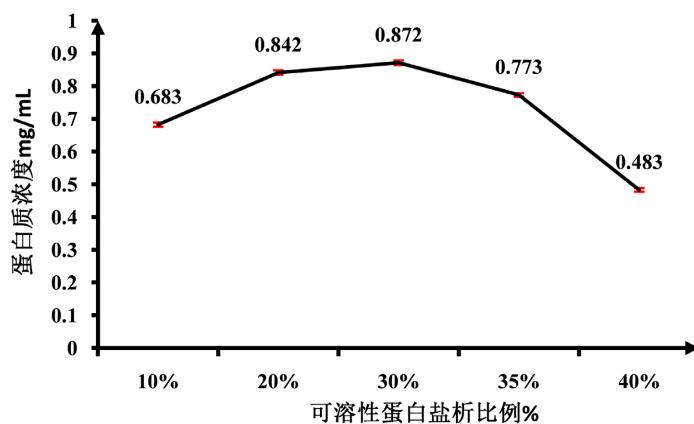


Figure 10. The concentration of soluble protein at low salting-out concentration

图 10. 低浓度盐析条件下可溶性蛋白浓度

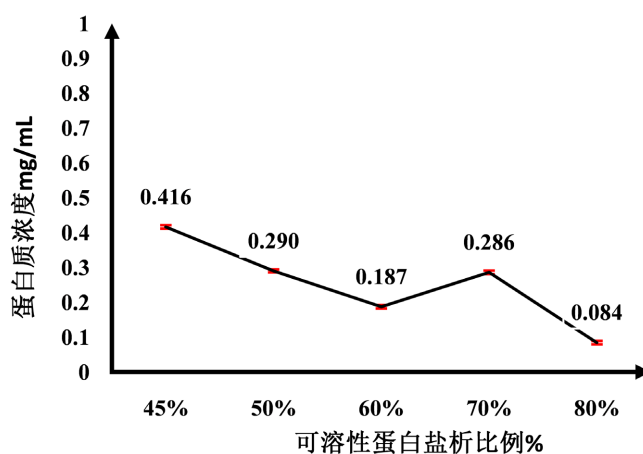


Figure 11. The concentration of soluble protein at high salting-out concentration

图 11. 高浓度盐析条件下藻蓝蛋白浓度

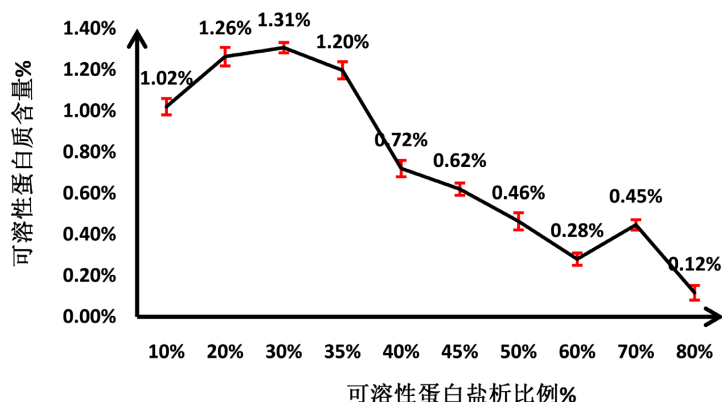


Figure 12. The content of soluble protein at different salting-out concentrations
图 12. 不同盐析条件下可溶性蛋白含量

4. 讨论

螺旋藻不同破壁技术[10] [11] [12] [13] [14], 都有不同程度的蛋白质溶出率, 实验用反复冻融法、超声波破碎法、反复冻融联合超声波破碎法来比较蛋白质溶出率的优劣, 经过在不同条件下进行单因素实验发现冻融法联合超声波破壁蛋白溶出率最好, 充分使细胞破碎, 蛋白溶出率达到 90% 以上, 可溶性蛋白溶出率达到 25.56%, 这使跟张会林等[15]研究结果接近一致, 在超声波破碎时, 文献研究结果为时间 25 min, 超声波功率 600 W, 可溶性蛋白提取率达到 15.24%, 与本实验结果在超声时间、超声功率上有所相差, 未能提取出文献中提取率, 认为超声波功率过小导致未能充分使细胞破壁。反复冻融法在固液比例 1:30 mg/g, 冻融时间 4 h, 冻融次数 4 次下溶出率达到 15.5%, 这是跟罗爱国等[16]研究在 1:20 mg/g 的固液比例, 8 次冻融次数条件下得到 27.1% 溶出率结果相差较大, 冻融时间的多少会直接影响蛋白溶出率。注意在冻融溶液时冻融时间放长, 使完全冻透, 才可使冰晶完全刺破细胞壁, 使盐浓度上升, 在超声波破碎细胞时用冰块紧紧包裹住溶液为其降温, 避免以为过多时间的超声波破碎下使蛋白质被破坏掉。

凯式定氮法提取总蛋白含量, 实验最终得出含量为 62.5%, 在螺旋藻蛋白质含量范围内, 但在消化过程中密切关注消解颜色变化, 过多过少的消解会影响蛋白质含量, 在蒸馏滴定过程中, 尤其注意盐酸滴定含量, 加多加少都会使实验结果有误差。螺旋藻破壁滤渣利用及滤渣中剩余蛋白的提取制备需进一步开展研究。

5. 结论

- 1) 利用凯式定氮法测量螺旋藻总蛋白含量, 滴定样品用去盐酸平均 8.58 mL, 滴定空白用去的盐酸平均 1.44 mL, 最终得出螺旋藻总蛋白含量为 62.50%。
- 2) 本实验利用反复冻融法, 超声波破碎法以及反复冻融法联合超声波破碎法破碎螺旋藻细胞壁得出最佳的蛋白质溶出条件以及蛋白溶出率, 实验结果表明, 在反复冻融法联合超声波破碎条件下蛋白溶出率最好, 能达到 90% 以上, 可溶性蛋白溶出率达到 25.56%, 在冻融次数为 4 次、超声波次数为 4 次、固液比例在 1:30 的条件下可溶性蛋白含量最高, 可溶性蛋白质含量最高到达 25.52%。
- 3) 利用螺旋藻粉通过冻融联合超声破壁、盐析分离可溶性蛋白、透析除盐、干燥或不干燥等工艺过程可获得螺旋藻蛋白制剂。

基金项目

鄂托克旗螺旋藻产业园区管委会横向项目: 螺旋藻蛋白粉加工工艺研究; 鄂尔多斯市科技重大专项:

高附加值富铁锌硒钝顶螺旋藻分级蛋白产品开发及产业化关键技术研究(2021 ZD I 22-6); 鄂尔多斯市科技计划项目: 高适应性螺旋藻种的选育及产业化(2022YY023); 鄂尔多斯市科技计划项目: 高产富硒螺旋藻粉生产关键技术攻关。

参考文献

- [1] 詹源文, 王盛民, 罗兰, 等. 螺旋藻超高压撞击流破壁实验研究[J]. 现代食品科技, 2010, 26(5): 451-453.
- [2] 谢林明, 陈建军, 朱仁华, 等. 螺旋藻细胞的破壁研究[J]. 嘉兴高等专科学校学报, 1999, 12(2): 39-40.
- [3] 郭锁莲, 于雪, 边新宇, 等. 响应曲面法优化螺旋藻的酶解破壁工艺[J]. 食品工艺, 2019, 40(10): 225-227.
- [4] 朱世斌. 微粉工程技术在药剂领域中的应用[J]. 中国粉体技术, 2001, 7(专辑): 1-8.
- [5] 吕冰心, 常蓉, 李博生. 基于蛋白质组学对螺旋藻在高温胁迫下响应机制的初步研究[J]. 植物生理学报, 2018, 54(5): 904-916.
- [6] 余程明, 屈思雨, 许怡宁, 等. 钝顶螺旋藻蛋白提取物的延缓衰老功效研究[J]. 食品科技, 2018, 43(4): 228-234.
- [7] Chattopadhyaya, I., Gupta, S., Mohammed, A., et al. (2015) Neuroprotective Effect of Spirulina Fusiform and Aman-tadine in the 6-OHDA Induced Parkinsonism in Rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **15**, 296-306. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0815-0>
- [8] 王政. 螺旋藻的营养价值及应用[J]. 才智, 2014(27): 373-373.
- [9] Sun, L., Wang, S.M. and Qiao, Z.Y. (2006) Chemical Stabilization of the Phycocyanin from Cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Journal of Biotechnology*, **121**, 563-569. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.08.017>
- [10] 王晓玲. 微波技术在天然药物生产中的应用[J]. 中药研究与信息, 2002, 4(1): 22-24.
- [11] 范如意, 李丽华, 李金婵, 卢晓莉, 韩美娜, 朱宏. 粉碎技术在食品工业中的应用[J]. 现代食品, 2018(15): 54-57.
- [12] 吴秉衡. 21世纪新型溶剂萃取技术及应用研究[J]. 机械管理开发, 2010, 25(4): 34-35.
- [13] 张树成, 杨进洁, 武世敏, 臧庆佳, 杨国栋. 一种高纯度白蛋白的提取方法[P]. 中国, CN111620937A. 2020-09-04.
- [14] 郭锁莲, 于雪, 边新宇, 等. 响应曲面法优化螺旋藻的酶解破壁工艺[J]. 食品工艺, 2019, 40(10): 225-227.
- [15] 张会林, 陈晶晶. 地木耳细胞的破碎和藻蓝蛋白提取工艺的研究[J]. 桂林理工大学化学与生物工程学院, 食品工业, 2017, 38(10): 112-115.
- [16] 罗爱国, 范瑶瑶. 多目标因素钝顶螺旋藻蛋白提取工艺分析[J]. 晋中学院生物科学与技术学院, 食品工业, 2021, 2(42): 100-103.