

热蒸汽 - NaOH 法提取小球藻蛋白质的研究

江怀真¹, 刘天中^{2*}, 高莉丽¹, 张维²

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266003; 2. 中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 山东青岛 266101)

摘要 [目的] 研究小球藻蛋白质的提取方法, 优化热蒸汽 - NaOH 法提取小球藻蛋白质的最适工艺条件。[方法] 采用热蒸汽与盐、碱液共同处理小球藻细胞, 考察蒸汽压力、提取时间、固液比(藻粉: 水, g: ml)、NaOH 添加比(占藻粉量的百分比)对小球藻蛋白质提取率的影响。[结果] 热蒸汽与碱液相结合更有利于小球藻蛋白质的溶出, 且 90% 以上的小球藻蛋白可能为碱溶性蛋白, 优化后的小球藻蛋白质的最适提取工艺条件为: NaOH 添加比为 20%, 固液比为 1: 50, 提取时间为 45 min, 蒸汽压力为 0.075 MPa, 此条件下小球藻蛋白质提取率达到 91.19%。[结论] 热蒸汽与碱液共同处理小球藻细胞能明显提高小球藻蛋白质的提取率。

关键词 小球藻; 蛋白质; 提取率; 工艺条件; 优化

中图分类号 S963.21⁺³ **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)33-16204-03

Research on the Protein Extracted from Chlorella with the Method of Thermal Steam-NaOH

JIANG Huai-zhen et al (College of Food Science and Engineering, China Ocean University, Qingdao, Shandong 266003)

Abstract [Objective] The process conditions of the protein extracted from chlorella with the method of thermal steam-NaOH were optimized through the study on its extraction method. [Method] The effect of the steam pressure, extraction time, ratio of solid-liquid (algae powder-water) and amount of adding NaOH (the percentage in algae powder) on the rate of protein extracted from chlorella was experimented after the chlorella cells were treated with thermal steam and solution of salt or alkali together. [Results] The results showed that the combing treatment of thermal steam and alkali solution was more conducive to the dissolution of chlorella protein and more than 90% of chlorella protein may be alkali-soluble protein. The best extraction condition of optimized chlorella protein was: the amount of adding NaOH, 20%; the ratio of solid-liquid, 1: 50; the extraction time, 45 minutes and the steam pressure, 0.075 MPa; under which condition, the rate of protein extracted from chlorella was 91.19%. [Conclusion] The combing treatment of thermal steam and alkali solution could significantly increase the rate of protein extraction from chlorella cells.

Key words Chlorella; Protein; Extraction rate; Process condition; Optimization

小球藻是一类普生性单细胞绿藻, 其种类繁多, 生态类型多样, 在淡水、海水中均有分布, 而以淡水水域为多, 在人工培养基中也能良好生长^[1-2]。小球藻含丰富的蛋白质、低糖、低脂肪, 是良好的营养源食品, 具有抑瘤、抗癌、增强免疫、抗感染能力、解毒保肝、降压作用^[3]。小球藻的粗蛋白含量可达 50% 以上, 而且品质也很好^[4]。来自 *C. pyrenoidosa* 中的蛋白质样品必需氨基酸指数为 62%^[5], 因此小球藻是一种良好的蛋白源。

传统的植物蛋白的提取方法主要是采用碱法提取^[6-7], 如陈正行用碱法提取米糠浓缩蛋白, 其蛋白提取率达到了 93.7%^[8]。由于小球藻有比较完整的细胞壁结构, 因此其胞内蛋白质的提取比较困难, 一般都需要进行破壁处理才能有效提取。目前传统的小球藻蛋白质提取方法大多还是采用反复冻融、超声、酶法破壁后进行提取, 提取率低, 处理量小, 能耗高。因此, 寻找更简单高效的小球藻蛋白质提取方法具有重要意义。笔者借鉴植物蛋白质和其他藻类蛋白质提取方法进行试验研究^[9-11], 以小球藻粉为原料, 提出利用热蒸汽和碱液共同处理^[12-14], 实现细胞破壁和蛋白质溶解, 再经离心等步骤提取胞内蛋白质的方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料 小球藻粉, 购于山东无棣绿奇生物有限公司; 所用试剂均为分析纯。

1.2 试验方法 小球藻干粉总氮含量测定: 采用凯氏定氮法^[15]。

基金项目 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX2-YW-G-060)。

作者简介 江怀真(1984-), 女, 福建泉州人, 硕士研究生, 研究方向: 微藻的规模化培养。* 通讯作者, E-mail: Liutz@qibebt.ac.cn。

收稿日期 2009-07-23

小球藻蛋白质提取方法: 称取适量的小球藻粉按一定比例加蒸馏水, 充分复水后, 加入一定比例的盐、碱(添加量相对于干藻粉量), 分别于 60 °C 水浴中保温进行蛋白质提取 3 h, 或将提取体系置于灭菌锅内, 在维持一定蒸汽压力下提取反应一定时间。提取反应结束后将提取液取出冷却后, 在 4 000 r/min 下离心 20 min, 收集上清液, 采用凯氏定氮法测定其中的蛋白含量。

该试验添加的盐、碱分别是: NaCl、Na₂CO₃、NaOH、KOH。小球藻蛋白质提取率的计算公式如下:

$$\text{蛋白质提取率}(\%) = \frac{\text{提取液中蛋白质含量}}{\text{小球藻粉蛋白质含量}}$$

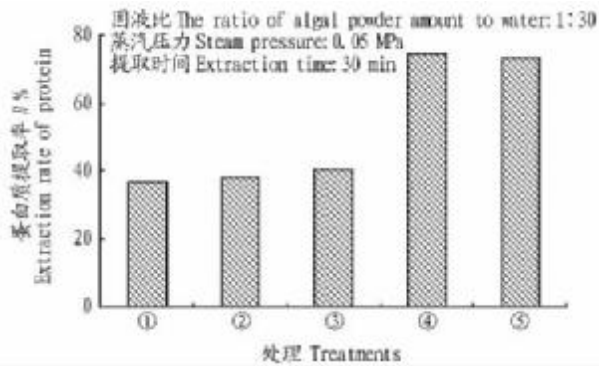
对于该试验所用的小球藻粉, 测定其中的蛋白质含量为 55.8%。

2 结果与分析

2.1 热蒸汽及盐、碱对小球藻蛋白质提取率的影响 试验安排了 2 组, 一组是在蒸汽条件下添加盐或碱液 (NaCl、Na₂CO₃、NaOH、KOH) 处理, 进行蛋白质的提取; 另一组是不用蒸汽处理, 在热水条件 (60 °C 水浴) 下进行蛋白质提取。其结果如图 1、2 所示。

由图 1、2 可见, 在热蒸汽的共同作用下, 添加 NaCl、Na₂CO₃ 对小球藻蛋白质的提取率与对照组比较, 稍有提高, 但相差不大。但当添加碱后, 小球藻蛋白质提取率明显提高。这表明在热蒸汽条件下, 碱的添加明显有助于小球藻蛋白质的溶出, 其提取率约为对照组的 2 倍。而对照不用蒸汽处理的 60 °C 水浴提取, 其提取率也明显不同, 表明热蒸汽也有利于蛋白质的溶出。事实上, 对比图 2 中的处理①和③, 也可以看出蒸汽处理对于提高蛋白提取率有明显作用。

对已机械破壁的小球藻粉分别进行了水提和碱提 (15%



注:①. 对照;②. 加藻粉量 15% 的 NaCl;③. 加藻粉量 15% 的 Na_2CO_3 ;④. 加藻粉量 15% 的 NaOH;⑤. 加藻粉量 15% 的 KOH。

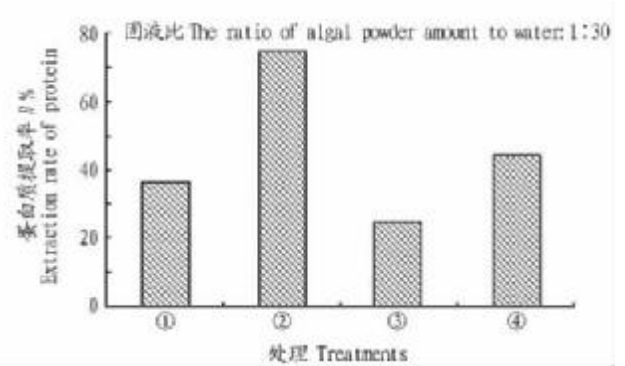
Note:①. Control;②. Adding 15% NaCl to algal powder; ③. Adding 15% Na_2CO_3 to algal powder;④. Adding 15% NaOH to algal powder;⑤. Adding 15% KOH to algal powder.

图1 盐、碱的加入对小球藻蛋白质提取率的影响

Fig.1 The effects of adding salt or alkali on the extraction rate of protein from *Chlorella* sp.

NaOH, 60 °C 水浴), 其蛋白质提取率分别为 29.8% 和 85.4%, 碱提法的蛋白质提取率约是水提法的 2.9 倍。但其与图 1 的处理④、⑤比较, 蛋白质提取率并没有明显提高。这表明对于小球藻细胞蛋白质的提取, 破壁方式并不是主要的决定因素, 碱的加入才是提高蛋白质提取率的关键。这是因为, 碱液可以对蛋白质分子的次级键特别是氢键具有破坏作用, 并可使某些极性基团发生解离, 使蛋白质分子表面具有相同的电荷, 从而对蛋白质分子有增溶作用, 提高了蛋白质提取率^[16], 大部分小球藻蛋白质可能是碱溶性蛋白质。

2.3 热蒸汽 - NaOH 提取小球藻蛋白质的工艺条件 试验考察了利用热蒸汽 - NaOH 提取小球藻蛋白质时 NaOH 添加比(对藻粉的百分比)、固液比(g: ml)、提取时间(min)、蒸汽压力(MPa)对小球藻蛋白质提取率的影响, 其结果分别示于图 4~7。



注:①、③. 对照;②、④. 加藻粉量 15% 的 NaOH;①、②. 在热蒸汽(0.05 MPa)中处理 30 min;③、④. 在 60 °C 水浴中提取 3 h。

Note:① and ③. Control; ② and ④. Adding 15% NaOH to algal powder; ① and ②. were treated under hot steam (0.05 Mpa) for 30 min; ③ and ④. were treated under 60 °C water bath for 3 h.

图2 热蒸汽对小球藻蛋白质提取率的影响

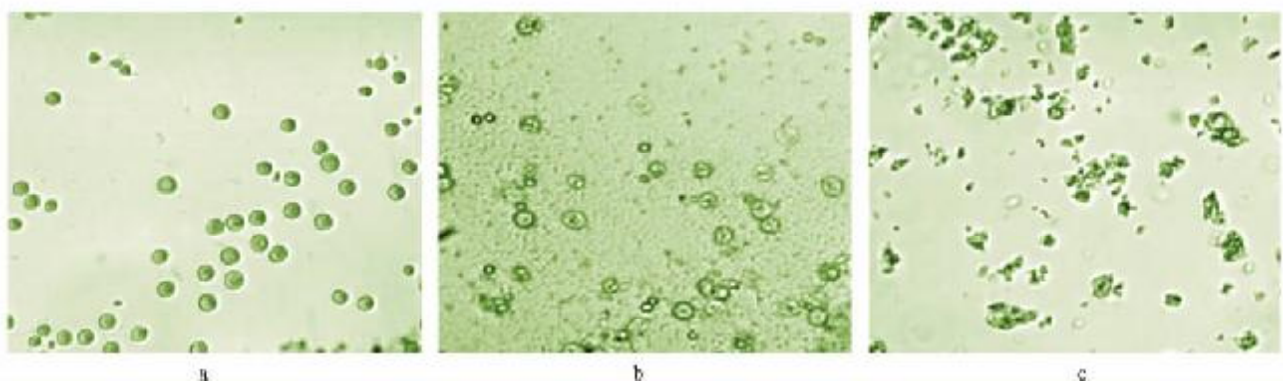
Fig.2 The effects of hot steam on the extraction rate of protein from *Chlorella* sp.

2.2 热蒸汽 - NaOH 处理对小球藻细胞形态的影响 经热蒸汽与 NaOH 溶液处理后的小球藻细胞和未经任何处理的, 以及机械破碎藻细胞的形态比较如图 3 所示。由图 3 可以看出, 小球藻在未处理前是饱满的球体(图 3a), 呈鲜绿色; 在经过热蒸汽和 NaOH 溶液的共同作用后, 小球藻外形成干瘪状, 且内含物绝大多数已溶出, 近似为一个空壳(图 3b), 呈淡绿色; 而机械处理的小球藻细胞则是大小不一的碎片(图 3c)。由此可知, 热蒸汽 - NaOH 法的破壁方式与机械处理不同, 并不是使其彻底崩溃破碎, 而可能是使细胞壁出现裂口, 从而使内容物从裂口处溶出。

到经济效益, 在后续试验中, 选定 20% 为最佳 NaOH 添加比。

由图 5 可以看出, 随着水量的增加, 蛋白质提取率增大, 而固液比为 1:50 时蛋白质提取率达到最大值。

综合图 4、5 的结果可以得出, 当 NaOH 浓度过高时, 蛋白质变性严重, 导致其溶解率下降, 而浓度太低, 蛋白质提取



注:a. 未处理;b. 热蒸汽 - NaOH 处理;c. 机械破碎。

Note:a. Untreated; b. Treated with hot steam and 15% sodium hydroxide; c. Machinery rupture powder.

图3 热蒸汽 - NaOH 处理对小球藻细胞形态的影响

Fig.3 Effects of hot stream and NaOH on the cell morphology of *Chlorella* sp.

从图 4 可以看出, 随着 NaOH 添加比的增加, 小球藻蛋白质提取率显著提高, 当 NaOH 添加比在 20%~25% 时, 蛋白质提取率变化不大(80.61%~82.74%); 但当添加比达到 25% 时, 若继续提高 NaOH 量, 提取率反而下降。因此, 考虑

效果又不理想, 同时水作为溶剂, 在小球藻蛋白质溶出过程中也起到一定的作用。

从图 6 可知, 提取时间的延长, 小球藻蛋白质提取率明显增加。当提取时间达到 45 min 后, 蛋白质提取率达到

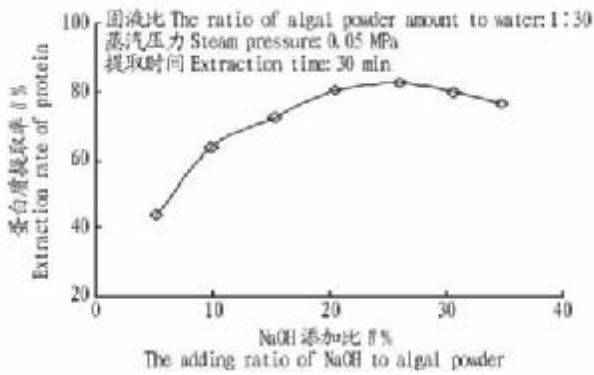


图4 NaOH添加比对小球藻蛋白质提取率的影响

Fig. 4 The effects of the adding ratio of sodium hydroxide to algal powder on the extraction rate of protein from *Chlorella* sp.

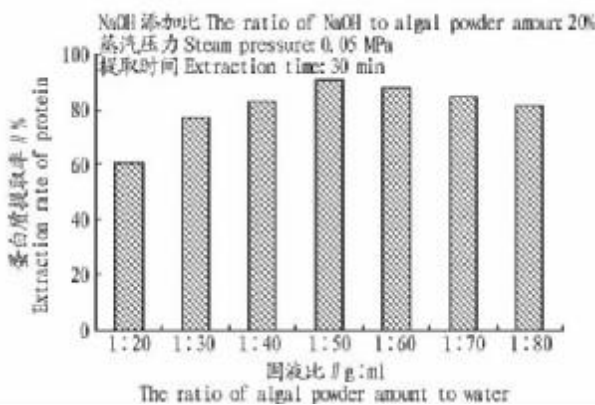


图5 固液比对小球藻蛋白质提取率的影响

Fig. 5 The effects of the solid-liquid ratio on the extraction rate of protein from *Chlorella* sp.

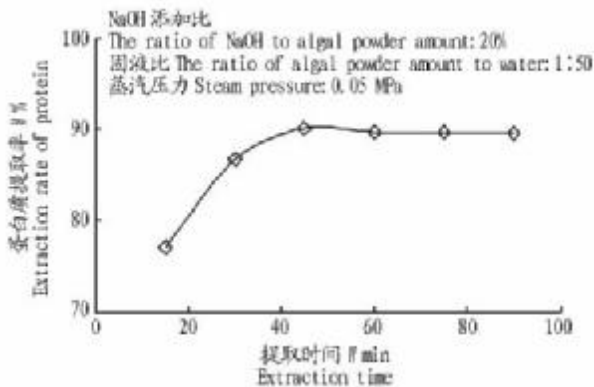


图6 提取时间对小球藻蛋白质提取率的影响

Fig. 6 The effects of extraction time on the extraction rate of protein from *Chlorella* sp.

90%左右后不再增加,这可能是小球藻中绝大部分碱可溶性蛋白已基本溶出完毕,余下的可能是少许酸溶性蛋白质。

从图7可以看出,对于小球藻蛋白质的提取,有一个最适压力范围。在最适蒸汽压力以下,蛋白质提取率随蒸汽压力增加而提高。当蒸汽压力超过0.075 MPa,再增大压力蛋白质提取率反而下降。这可能是由于提取体系的温度过高,蛋白质变性严重,反而降低了蛋白质的溶解度。

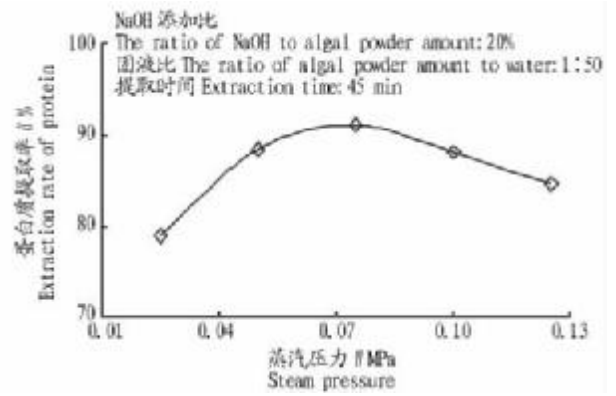


图7 蒸汽压力对小球藻蛋白质提取率的影响

Fig. 7 The effects of steam pressure on the extraction rate of protein from *Chlorella* sp.

3 结论

(1)热蒸汽与NaOH溶液共同处理可以明显提高小球藻蛋白质的提取率,且90%以上的小球藻蛋白质可能为碱溶性蛋白质。

(2)热蒸汽-NaOH法提取小球藻蛋白质的最适条件为:NaOH添加比为20%,固液比为1:50,提取时间为45 min,蒸汽压力为0.075 MPa,此条件下小球藻蛋白质提取率达到91.19%。

参考文献

- [1] 陈颖,李文彬,孙勇如. 小球藻生物技术研究应用现状及展望[J]. 生物工程进展, 1998, 18(6): 12-16.
- [2] BROCK T D, SMITH D W, MADIGAN M T. Biology of Microorganisms [M]. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1984: 760-769.
- [3] 李师翁, 李虎乾. 植物单细胞蛋白资源——小球藻开发利用研究的现状[J]. 生物科技, 1997, 7(3): 45-48.
- [4] 何扩, 张秀媛, 李玉峰. 小球藻破壁技术及其藻片研制[J]. 食品工业科技, 2006(2): 32-33.
- [5] SCOTT G T. The mineral composition of *Chlorella pyrenoidosa* grown in culture media containing varying concentration of calcium, magnesium, potassium and sodium[J]. Journal of Cellular and Comparative Physiology, 1943, 2: 327-328.
- [6] 王亚林, 陶兴元, 钟放旭, 等. 碱酶两步法提取米渣中蛋白质的工艺研究[J]. 中国油脂, 2002, 27(3): 53-54.
- [7] 孙庆杰, 田正文. 碱法提取浓缩大米蛋白工艺条件的研究[J]. 食品工业科技, 2003, 24(9): 38-40.
- [8] 陈正行. 米糠浓缩蛋白的提取及功能性评价[J]. 食品与发酵工业, 2000, 26(4): 17-19.
- [9] 陈兴才, 李翔, 刘杏珠, 等. 螺旋藻蛋白质提取工艺研究[J]. 福州大学学报: 自然科学版, 1999, 27(6): 107-110.
- [10] 冯志彪, 李冬梅. 螺旋藻蛋白质提取及其性质研究[J]. 山西食品工业, 2001(2): 8-10.
- [11] TAKEHISA K, HIROYUKI K, TAKAO F, et al. Production of rice protein by alkaline extraction improves its digestibility[J]. Nutr Sci Vitaminol, 2006, 52: 467-472.
- [12] SEOG J L, BYUNG-DAE Y, HEE-MOCK O. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*[J]. Biotechnology Techniques, 1998, 12(7): 553-556.
- [13] MEIJER E A, WIJFFELS R H. Development of a fast, reproducible and effective method for the extraction and quantification of proteins of micro-alga[J]. Biotechnology Techniques, 1998, 12(5): 353-358.
- [14] THOMAS R. The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. Comparison of methods for extracting protein[J]. Hydrobiologia, 1981, 78: 237-251.
- [15] 李建武, 余瑞元, 袁明秀, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1997: 160-164.
- [16] 王文高, 陈正行, 姚惠源. 不同蛋白酶提取大米蛋白质的研究[J]. 粮食与饲料工业, 2002(2): 41-42.