

酶解结合物理法对雨生红球藻破壁处理的工艺研究

Study of the cell wall- breaking process by
enzyme combined with physical method for haematococcus pluvialis

余绍蕾* 杜伟春 鸭 乔

(云南绿 A 生物工程有限公司, 云南昆明 650106)

YU Shaolei* DU Weichun YA qiao

(Yunnan green A biological project Co., Ltd, Yunnan Kunming 650106, China)

摘 要 采用酶解结合物理法对雨生红球藻的破壁工艺进行了研究, 以破壁孢子率为评价指标, 通过正交试验筛选酶解条件, 对比试验进行验证。试验结果表明, 雨生红球藻的最佳破壁工艺为: 选用复合纤维素酶对雨生红球藻进行酶解处理, 酶添加量 0.5%, 酶解温度 45 °C, 酶解时间 5 h, 酶解后结合高压均质法进行破壁, 均质压力 40 MPa, 均质 2 次。在此工艺条件下, 雨生红球藻的破壁孢子率较原工艺提高 18.07%。酶解结合高压均质法用于雨生红球藻粉破壁具有效率高、成本低的优点, 适用于工业化生产。

关键词 雨生红球藻; 虾青素; 酶解; 高压均质; 破壁

Abstract To study the cell wall- breaking process by enzyme combined with physical method for Haematococcus pluvialis. Methods: Cell wall- breaking rate was as the evaluation index. Orthogonal test method was used to concern enzymolysis conditions, and verified by contrast experiment. Results: The enzymolysis conditions identified as: composite cellulose enzyme, adding amount of 0.5%, enzyme solution temperature 45 °C, enzymolysis time 5 h, homogeneous pressure 40 Mpa, homogeneous 2 times. Compared with the original method, cell wall- breaking rate of new method increased 18.07%. Conclusion: Enzyme combined with physical method is high efficiency, low cost for breaking Haematococcus pluvialis cell wall, and is suitable for industrialized production.

Keywords haematococcus pluvialis; astaxanthin; enzymolysis; high pressure homogeneous; cell disruption

中图分类号: TS254.7

文献标识码: A

文章编号: 1673- 6044(2016)04- 0038- 03

DOI: 10.3969/j.issn.1673- 6044.2016.04.010

雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 是一种单细胞绿藻, 属于绿藻门 (*Chlorophyta*) 绿藻纲 (*Chlorophyceae*) 团藻目 (*Volvocales*) 红球藻科 (*Haematococcaceae*) 红球藻属 (*Haematococcus*)。雨生红球藻在特定生态环境中能形成厚壁孢子, 积累大量的虾青素, 是自然界中能够大量合成和积累虾青素的生物, 也是自然界中天然虾青素含量最高

的生物。近年来, 由于天然虾青素的超抗氧化功效得到了广泛认可, 雨生红球藻的需求量也不断增加, 其养殖、加工技术也在不断地改进。由于雨生红球藻的孢子壁较厚, 如不进行破壁处理, 虾青素不易被提取, 且吸收利用率低, 故雨生红球藻加工的关键技术之一就是破壁处理。传统的破壁方法主要为物理法, 但存在缺陷。本研究采用酶解结合物理技术对雨生红球藻进行破壁处理, 以期对雨生红球藻破壁技术提供更好的方法。

* 余绍蕾, 女, 1983 年出生, 2008 年毕业于暨南大学药理学专业, 工程师。

收稿日期: 2016- 11- 25

1 材料与仪器

1.1 材料

雨生红球藻粉,云南绿A生物工程有限公司;复合纤维素酶、复合果胶酶、复合多糖酶,诺维信(中国)投资有限公司。

1.2 试剂

二甲基亚砷(DMSO)、二氯甲烷、正己烷,均为分析纯。

1.3 仪器

紫外分光光度计,上海光谱仪器有限公司;高压均质机,苏州微流纳米生物技术有限公司;磁力搅拌机,郑州新中原机器制造有限公司。

2 试验方法

2.1 酶法-高压均质破壁工艺流程

精确称取干燥的雨生红球藻粉100 g,加入纯化水900 mL,摇匀,加入柠檬酸调节pH值,按试验设计量加入复合果胶酶,控制反应温度缓慢搅拌,到达反应时间后,倒入均质机进行高压均质,均质压力40 MPa,均质2次。均质后喷雾干燥,得破壁雨生红球藻粉。

2.2 高压均质破壁工艺流程

精确称取干燥的雨生红球藻粉100 g,加入纯化水900 mL,摇匀,倒入均质机进行高压均质,均质压力40 MPa,均质2次。均质后喷雾干燥,得破壁雨生红球藻粉。

2.3 破壁率检测方法

2.3.1 二甲基亚砷提取及虾青素含量的测定

准确称量藻粉 W_1 mg(约20 mg)于10 mL离心管中,加入5 mL DMSO,70℃提取5 min,提取过程中摇动离心管,使藻粉与溶剂混匀,促进虾青素的提取;5 000 r/min离心5 min,收集上清液;重复提取1次,合并提取液,用DMSO定容至25 mL,充分混匀后取1 mL于10 mL容量瓶中,用DMSO定容后,用1 cm光径比色杯,在530 nm处测量吸光值,计算样品虾青素含量:

$$C_1=100\times\frac{A_1\times10\times250}{1556W_1},$$

式中: C_1 ——样品中虾青素含量,%;
 A_1 ——530 nm处样品的吸光值;
 W_1 ——称取藻粉的质量,mg。

2.3.2 二氯甲烷-正己烷提取及虾青素含量的测定

准确称量藻粉 W_2 mg(约20 mg)于10 mL离心管中,加入5 mL二氯甲烷-正己烷(7:3)混合溶液,室温提取虾青素,提取过程中摇动离心管,使藻粉与溶剂混匀,促进虾青素的提取;5 000 r/min离心5 min,收集上清液;重复提取1次,合并提取液,用二氯甲烷-正己烷(7:3)混合溶液定容为25 mL,充分混匀后取1 mL于10 mL容量瓶中,用二氯甲烷-正己烷(7:3)混合溶液定容后,用1 cm光径比色杯在530 nm处测量吸光值,计算样品虾青素含量:

$$C_2=100\times\frac{A_2\times10\times250}{1556W_2},$$

式中: C_2 ——样品中虾青素的含量,%;
 A_2 ——530 nm处样品的吸光值;
 W_2 ——称取藻粉的质量,mg。

2.3.3 破壁孢子率计算

$$R=\frac{C_2}{C_1}\times100\%,$$

式中: R ——破壁孢子率,%;
 C_1 ——二甲基亚砷提取时样品中虾青素含量,%;
 C_2 ——二氯甲烷-正己烷提取时样品中虾青素含量,%。

2.4 酶解参数筛选

以酶的种类(A)、酶解温度(B)、酶解时间(C)、酶添加量(D)为4个因素,分别设置3个水平,以破壁孢子率为评价指标,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验。正交试验因素水平设计见表1。

表1 正交试验因素与水平

水平	因素			
	A 酶种类	B 酶解温度 ℃	C 酶添加量 %	D 酶解时间 h
1	复合果胶酶	40	0.2	3
2	复合纤维素酶	45	0.5	5
3	复合多糖酶	50	1.0	8

2.5 对比试验

分别以正交试验得出的最佳工艺参数进行3次重复试验,与物理破壁法得到的破壁率进行比较。

3 结果与分析

3.1 正交试验结果与分析

正交试验结果及分析见表2。

表2 正交试验设计结果与分析

试验号	A	B	C	D	破壁孢子率 %
1	1	1	1	1	95.52
2	1	2	2	2	91.30
3	1	3	3	3	92.42
4	2	1	2	3	88.35
5	2	2	3	1	85.27
6	2	3	1	2	83.44
7	3	1	3	2	80.45
8	3	2	1	3	80.27
9	3	3	2	1	80.11
K_1	279.24	264.32	259.23	260.90	
K_2	297.24	282.32	277.23	278.90	
K_3	240.83	255.97	258.14	261.04	
R	56.41	26.35	19.09	18.00	

由极差分析可知,各因素对破壁率影响的主次顺序为:酶的种类>酶解温度>酶添加量>酶解时间。根据正交试验确定的酶反应最佳条件为: $A_2B_2C_2D_2$,即酶种类为复合纤维素酶,酶解温度45℃,酶添加量0.5%,酶解时间5h。

3.2 对比试验结果

对比试验结果表明,采用酶法-高压均质破壁法对雨生红球藻粉进行破壁,其破壁孢子率较高压均质法提高了18.07%,对比试验结果见表3。

表3 对比试验结果

试验方法	破壁孢子率 %			
	1	2	3	平均
酶法-高压均质破壁	95.76	96.11	95.89	95.92
高压均质破壁	82.24	80.15	81.32	81.24

4 讨 论

雨生红球藻的有效成分—虾青素,存在于其厚壁细胞中,为使其含有的虾青素能得以应用,必须对其进行破壁处理。2011年国家卫生部已批准了雨生红球藻粉为新资源食品,将其破壁处理后,提取出来的虾青素可用于食品、保健食品、化妆品、

药品等诸多领域。传统的破壁法主要是物理破壁法,包括高压均质法、超声波法、冷冻法等。其中,高压均质法对高压均质机的要求较高,且生产中设备零件损耗较大,常常不能连续生产;超声波法设备昂贵、批处理量少,不适合于大规模生产;冻融法能耗大、操作周期长,且提取破壁效率低下。酶解法是近年来发展较为快速的提取方法之一,在中药的提取中,常用其进行预处理,可大大提高有效成分的提取效率。

本研究选用了酶法结合高压均质法进行雨生红球藻的破壁处理,以期能够改善原高压均质破壁存在的问题。孢子主要由纤维素、果胶、脂多糖等物质给成,故选取了纤维素酶、果胶酶和多糖酶对孢子进行处理,并对反应条件进行了筛选。试验结果表明,采用复合纤维素酶,酶添加量0.5%,酶解温度45℃,酶解时间5h条件下,酶解法结合高压均质破壁效果最好;对比试验结果显示,结合酶解法后,雨生红球藻的破壁孢子率提高了18.07%。在生产过程中,此方法对设备的磨损大大减少,机器可正常连续运转。其作用机理可能是通过纤维素酶使雨生红球藻孢子中的部分纤维素得以降解,从而降低孢子的硬度,利于后续高压均质的操作。酶解结合高压均质破壁相对于其他破壁法具有提取效率高、成本低、适于产业化生产的优点,有一定的推广价值。

参考文献

- [1] 高桂玲,成家杨,马炯.雨生红球藻和虾青素的研究[J].水产学报,2014,38(2):297-304.
- [2] 周锦珂,李金华,葛发欢,等.酶法提取雨生红球藻中虾青素的新工艺研究[J].中药材,2008,31(9):1423-1425.
- [3] 欧阳琴,陈兴才,黄亚治.雨生红球藻提取虾青素不同机械破壁方法的研究[J].福州大学学报(自然科学版),2005,33(1):111-115.
- [4] 赵晓燕,朱海涛,毕玉平,等.雨生红球藻中虾青素的研究进展[J].食品研究与开发,2016,37(4):191-195.
- [5] 陈兴才,欧阳琴,黄亚治.雨生红球藻物理破壁法提取虾青素研究[J].中国食品学报,2007,7(2):48-52.
- [6] 宋成英.酶解技术在中药提取中的应用研究[J].时珍国医国药,2013,24(8):1934-1935.