

超声波协同酶解提取坛紫菜藻红蛋白工艺优化

Optimization of phycoerythrin extraction from *Porphyra haitanensis* by ultrasound & hydrolysis

孔祥佳¹ 吴秋莹¹ 谢勇¹ 林埔¹ 刘智禹²

KONG Xiang-jia¹ WU Qiu-ying¹ XIE Yong¹ LIN Pu¹ LIU Zhi-yu²

(1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122; 2. 福建省水产研究所, 福建 厦门 361013)

(1. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China;

2. Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen, Fujian 361013, China)

摘要:采用单因素试验和响应面法确定坛紫菜藻红蛋白提取的最佳工艺条件。通过单因素试验探讨加酶量、超声时间、超声功率、pH、固液比对藻红蛋白得率和纯度的影响,并根据单因素试验结果固定 pH 为 5.0、固液比为 1:40 (g/mL),同时选取加酶量、超声时间和超声功率为影响因素进行响应面优化试验,确定坛紫菜藻红蛋白的最优提取工艺参数为:加酶量 0.05 g、超声时间 40 min、超声功率为额定功率的 90% (450 W)。该条件下藻红蛋白的得率和纯度分别为 (1.808±0.007)% 和 0.460±0.001。

关键词:坛紫菜;藻红蛋白;超声波;纤维素酶

Abstract: The optimization of phycoerythrin extraction from *Porphyra haitanensis* were investigated by single experiments and response surface methodology. The single experiments were used to explore the effects on the extraction rate and purity of phycoerythrin by different enzyme amount, ultrasonic time, ultrasonic power, pH and solid-liquid ratio. The best pH and solid-liquid ratio were determined as 5.0 and 1:40 (g/mL), respectively. Meanwhile, the enzyme amount, ultrasonic time and ultrasonic power were investigated through response surface experiment. The optimal extraction conditions were determined as follows: enzyme amount 0.05 g, ultrasonic time 40 min and ultrasonic power 90% of the rated one. Under these conditions, the extraction rate and purity of phycoerythrin were reached (1.808±0.007)% and 0.460±0.001, respectively.

Keywords: *Porphyra haitanensis*; phycoerythrin; ultrasound; cellulase

海藻中含有丰富的参与光合作用的捕光色素,主要包含叶绿素、类胡萝卜素和藻胆蛋白^[1]。藻胆蛋白是一种水溶性

捕光色素蛋白,按其最大特征吸收峰和呈色类型不同,又分为藻红蛋白(phycoerythrins, PE; λ_{\max} = 540~570 nm; 紫紫色)、藻蓝蛋白(phycoerythrins, PC; λ_{\max} = 610~620 nm; 蓝色)、别藻蓝蛋白(allophycocyanins, APC; λ_{\max} = 650~655 nm; 蓝绿色)、藻红蓝蛋白(phycoerythrocyanins, PEC; λ_{\max} = 560~600 nm; 橙色)四类^{[1][2]}。其中,对藻红蛋白的研究最多,并已广泛运用于食品色素添加剂^[3-4]、荧光探针^[3-4]、抗氧化^[5]、抗肿瘤^[5]等生物医学工程领域。紫菜是世界上分布较广的大型经济海藻之一,含有丰富的藻红蛋白,可为提取分离藻红蛋白提供优质的原材料^{[2][3-4,12][6-7]}。在藻红蛋白的分离技术中,合理有效地破碎原材料细胞膜和细胞壁结构尤为重要,已报道的提取方法有酶解法^[6,8]、超声波法^[7]、溶胀法^[7,9]、反复冻融法^[7,10]等。但施瑛等^[6]所采用的复合酶法提取紫菜藻红蛋白需耗时 7.2 h;何思佳等^[7]对比溶胀法及反复冻融法提取条斑紫菜藻红蛋白分别耗时 1 440 min 和 120 min×5 次,且提取率低。而超声波法是利用超声波的空化效应和机械作用破碎原材料的细胞膜和细胞壁结构,具有提取率高、提取时间短等优点^[7,11-14]。同时,纤维素酶利用酶催化反应的专一性降解原材料细胞壁中的纤维素从而破坏细胞壁结构,具有提取率高、提取温度低等优点。但目前将二者结合用于紫菜藻红蛋白提取的报道较少。本试验拟以福建省广泛分布的坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)为试材,采用超声波协同纤维素酶提取坛紫菜中的藻红蛋白,利用响应面法对提取工艺进行优化,以期开展坛紫菜有效物质研发及藻红蛋白大规模生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

坛紫菜:福建省水产研究所;

纤维素酶:10 000 U/g,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

浓盐酸:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

基金项目:农业行业标准制定和修订(编号:181721301092371054)

作者简介:孔祥佳(1983—),女,福建中医药大学讲师,博士。

E-mail: nihaojia2005@126.com

收稿日期:2017-07-14

1.2 仪器与设备

台式离心机:TDL80-2B型,上海安亭科学仪器厂;
 恒温水浴锅:KD-600S型,上海精宏实验设备有限公司;
 电子分析天平:CP144型,上海奥豪斯仪器有限公司;
 紫外可见分光光度计:UV9100型,北京瑞利分析仪器公司;

中药粉碎机:FW177型,天津市泰斯特仪器有限公司;
 数控超声波清洗器(额定超声功率为500W):KQ-500DE型,昆山市超声仪器有限公司;
 pH计:PHS-3C型,上海仪电科学仪器股份有限公司;
 磁力加热搅拌器:CJJ79-1型,金坛市白塔新宝仪器厂。

1.3 试验方法

1.3.1 藻红蛋白提取工艺流程

坛紫菜干→粉碎→过筛(60目)→按比例加入蒸馏水→调pH→添加纤维素酶酶解→超声波提取→离心→取上清液→检测藻红蛋白得率和纯度

1.3.2 坛紫菜藻红蛋白得率和纯度的测定 参照施瑛等^[6]的方法,按式(1)、(2)计算坛紫菜藻红蛋白的得率和纯度。

$$\begin{cases} \rho_{PE} = 0.123 \times A_{560\text{ nm}} - 0.068 \times A_{617\text{ nm}} + 0.015 \times A_{650\text{ nm}} \\ W = n \times \frac{\rho_{PE} \times V_{PE}}{1\ 000 \times M_{PE}} \times 100\% \end{cases}, \quad (1)$$

式中:

ρ_{PE} ——提取稀释液中藻红蛋白的质量—体积浓度,mg/mL;

$A_{560\text{ nm}}$ 、 $A_{617\text{ nm}}$ 、 $A_{650\text{ nm}}$ ——提取稀释液在560,617,650 nm的吸光值;

W ——藻红蛋白得率,%;

n ——稀释倍数;

V_{PE} ——提取液的体积,mL;

M_{PE} ——坛紫菜干品的质量,g。

$$P = \frac{A_{560\text{ nm}}}{A_{280\text{ nm}}}, \quad (2)$$

式中:

P ——藻红蛋白纯度;

$A_{280\text{ nm}}$ 、 $A_{560\text{ nm}}$ ——提取稀释液在280,560 nm的吸光值。

1.3.3 单因素条件对坛紫菜藻红蛋白得率和纯度的影响

(1) 加酶量:取2.0 g坛紫菜粉末,共8份,固液比1:40(g/mL),调pH至5.0,分别加入纤维素酶0.01,0.02,0.03,0.04,0.05,0.06,0.07,0.08 g,35℃酶解1 h后,于20℃下超声浸提30 min,超声功率为额定功率的70%(即350 W),10 000 r/min离心5 min,取上清液,检测藻红蛋白得率和纯度。

(2) 超声时间:取2.0 g坛紫菜粉末,共5份,固液比1:40(g/mL),调pH至5.0,加入纤维素酶0.02 g,35℃酶解1 h后,分别于20℃下超声浸提20,30,40,50,60 min,超声功率为额定功率的70%,10 000 r/min离心5 min,取上清液,检测藻红蛋白得率和纯度。

(3) 超声功率:取2.0 g坛紫菜粉末,共5份,固液比1:40(g/mL),调pH至5.0,加入纤维素酶0.02 g,35℃酶解

1 h后,于20℃下超声浸提30 min,超声功率分别为额定功率的60%,70%,80%,90%,100%(即300,350,400,450,500 W),10 000 r/min离心5 min,取上清液,检测藻红蛋白得率和纯度。

(4) pH:取2.0 g坛紫菜粉末,共5份,固液比1:40(g/mL),分别调pH至4.0,4.5,5.0,5.5,6.0,加入纤维素酶0.02 g,35℃酶解1 h后,于20℃下超声浸提30 min,超声功率为额定功率的70%,10 000 r/min离心5 min,取上清液,检测藻红蛋白得率和纯度。

(5) 料液比:取2.0 g坛紫菜粉末,共5份,固液比分别为1:20,1:30,1:40,1:50,1:60(g/mL),调pH至5.0,加入纤维素酶0.02 g,35℃酶解1 h后,于20℃下超声浸提30 min,超声功率为额定功率的70%,10 000 r/min离心5 min,取上清液,检测藻红蛋白得率和纯度。

1.3.4 响应面优化试验 根据单因素试验结果与分析设计响应面试验,进一步优化超声波协同酶解提取坛紫菜藻红蛋白的工艺条件。

1.4 数据处理

各指标测定均重复3次,采用Excel进行数据统计,数据以3次独立样品测定结果的平均值±标准差表示,并采用ANOVA程序用于方差分析。

2 结果与分析

2.1 加酶量对坛紫菜藻红蛋白得率和纯度的影响

在酶催化反应环境(温度、底物浓度、pH)一定时,酶促反应与加酶量呈正比,但随着催化反应进行,底物浓度减少,催化反应速率降低^[12]。由图1可知,当纤维素酶添加量在0.01~0.05 g时,藻红蛋白得率升高、纯度增加;当加酶量为0.05 g时,藻红蛋白的得率和纯度最高,分别为1.469%和0.406;但随着纤维素酶添加量的进一步增加,藻红蛋白得率和纯度降低。综合考虑工业生产成本及藻红蛋白得率和纯度,选择纤维素酶添加量0.04,0.05,0.06 g作进一步研究。

2.2 超声时间对坛紫菜藻红蛋白得率和纯度的影响

由图2可知,坛紫菜藻红蛋白的得率和纯度均随超声时间的延长呈先升后降的趋势。超声提取20~30 min时,由于超声时间短,坛紫菜细胞壁破坏不完全,藻红蛋白溶出率较低;当超声提取40 min时,藻红蛋白得率和纯度均达到最

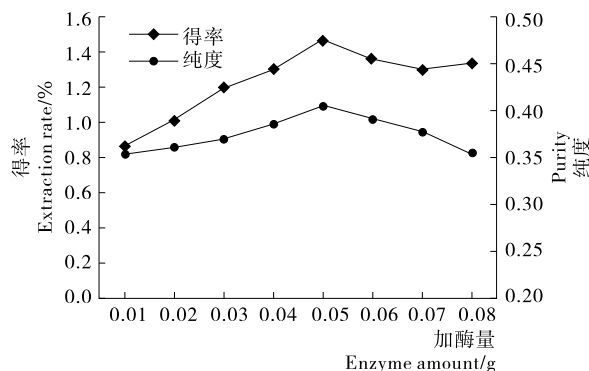


图1 加酶量对坛紫菜藻红蛋白得率和纯度的影响
 Figure 1 Effect of enzyme amount on the extraction rate and purity of phycoerythrin from *Porphyra haitanensis*

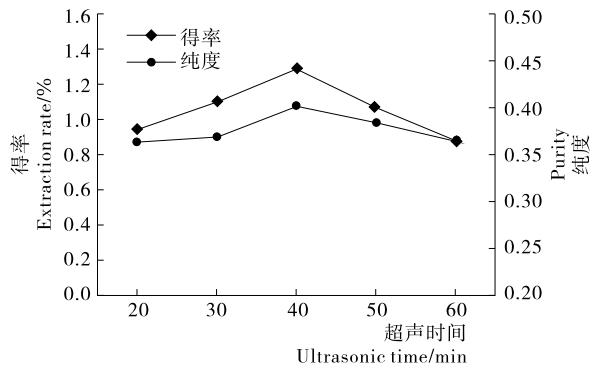


图 2 超声时间对坛紫菜藻红蛋白得率和纯度的影响

Figure 2 Effect of ultrasonic time on the extraction rate and purity of phycoerythrin from *Porphyra haitanensis*

大,分别为 1.298% 和 0.402;当超声提取 50~60 min 时,藻红蛋白得率和纯度快速降低,可能与超声时间过长导致藻红蛋白结构被破坏有关。综合考虑生产时间成本及藻红蛋白得率和纯度,选择超声时间 30,40,50 min 作进一步研究。

2.3 超声功率对坛紫菜藻红蛋白得率和纯度的影响

超声功率影响超声作用,超声功率越高,空化强度越大,超声效果越好,有效成分分离越快。由图 3 可知,藻红蛋白得率随着超声功率的不断增加而增大,当达到额定功率的 100% 时,藻红蛋白得率最高(1.380%)。但藻红蛋白纯度随超声功率的不断增加呈先升高后降低的趋势;超声功率为额定功率的 60%~90% 时,藻红蛋白纯度快速增加;当超声功率为额定功率的 90% 时,藻红蛋白纯度达到最大(0.398);而随着超声功率的继续升高,藻红蛋白纯度降低,可能与超声功率过高导致提取物中其它杂质溶出有关。综合考虑能量消耗成本及藻红蛋白得率和纯度,选择超声功率为额定功率的 80%,90%,100% 作进一步研究。

2.4 pH 对坛紫菜藻红蛋白得率和纯度的影响

由图 4 可知,坛紫菜藻红蛋白的得率和纯度均随 pH 值的增加先升高后降低,且在 pH 为 5.0 时,藻红蛋白的得率和纯度达到最大,分别为 1.001% 和 0.367。这是由于 pH 影响纤维素酶的活性,过酸或过碱的溶液均会降低纤维素酶的活性,导致藻红蛋白得率和纯度降低。进一步分析表明,在相同提取条件下,pH 值对藻红蛋白得率和纯度的影响显著

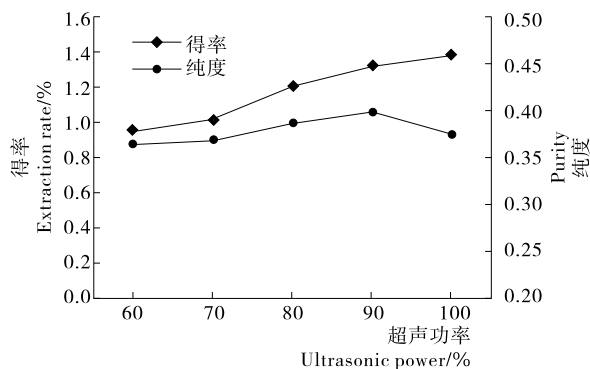


图 3 超声功率对坛紫菜藻红蛋白得率和纯度的影响

Figure 3 Effect of ultrasonic power on the extraction rate and purity of phycoerythrin from *Porphyra haitanensis*

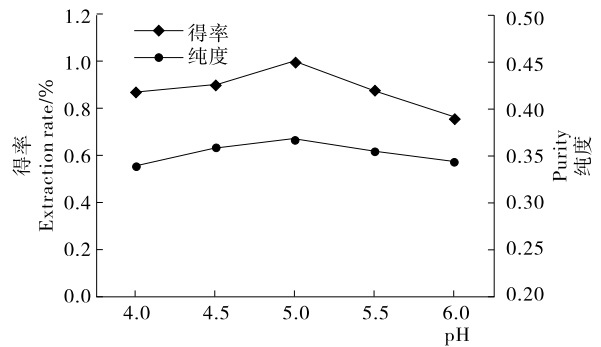


图 4 pH 对坛紫菜藻红蛋白得率和纯度的影响

Figure 4 Effect of pH on the extraction rate and purity of phycoerythrin from *Porphyra haitanensis*

($P < 0.05$) 低于加酶量、超声时间、超声功率;因此,优化试验时固定酶解反应 pH 为 5.0。

2.5 固液比对坛紫菜藻红蛋白得率和纯度的影响

由图 5 可知,坛紫菜藻红蛋白的得率和纯度均随液固比的增大呈先升后降的趋势。当固液比为 1:40 (g/mL) 时,藻红蛋白的得率最高(1.008%);当固液比为 1:30 (g/mL) 时,藻红蛋白的纯度最大(0.376)。说明溶剂用量低,固液两相间的浓度差小,传质推动力弱,无法充分提取坛紫菜中的藻红蛋白;溶剂用量高,虽可增大固液两相间的浓度差,但也导致提取物中其它杂质的溶出,从而降低藻红蛋白的纯度。进一步分析表明,在相同提取条件下,固液比对藻红蛋白得率和纯度的影响显著($P < 0.05$) 低于加酶量、超声时间、超声功率;且固液比为 1:30 (g/mL) 时藻红蛋白的纯度与固液比为 1:40 (g/mL) 时差异不显著($P > 0.05$);因此,优化试验时固定固液比为 1:40 (g/mL)。

2.6 响应面试验结果

2.6.1 Box-Behnken 试验设计及结果 根据单因素试验结果及分析,鉴于 pH 值及固液比对坛紫菜藻红蛋白得率和纯度的影响较小,故采用响应面法优化坛紫菜藻红蛋白提取工艺时,考察加酶量、超声时间和超声功率对坛紫菜藻红蛋白得率和纯度的影响。响应面试验设计因素及水平见表 1,试验设计方案及数据处理结果见表 2。

2.6.2 模型建立及显著性分析 按照 Box-Behnken 试验设计的统计学要求,对试验数据进行二次多元回归拟合,获得

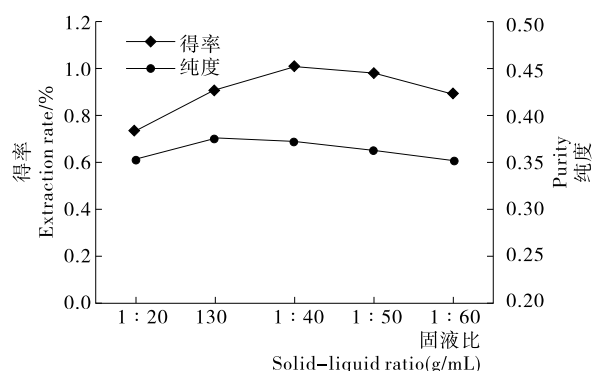


图 5 固液比对坛紫菜藻红蛋白得率和纯度的影响

Figure 5 Effect of solid-liquid ratio on the extraction rate and purity of phycoerythrin from *Porphyra haitanensis*

项目指标对影响因子的关系为：

$$Y_1 = 1.81 + 0.052X_1 - 0.026X_2 + 0.066X_3 + 0.007X_1X_2 - 0.03X_1X_3 - 0.012X_2X_3 - 0.14X_1^2 - 0.22X_2^2 - 0.011X_3^2, \quad (3)$$

$$Y_2 = 0.46 + 0.009X_1 + 0.001X_2 - 0.008X_3 - 0.002X_1X_2 + 0.014X_1X_3 + 0.005X_2X_3 - 0.018X_1^2 - 0.038X_2^2 - 0.027X_3^2. \quad (4)$$

为检验上述二次多元回归方程的有效性,进一步对超声波协同酶解提取坛紫菜藻红蛋白得率和纯度的系数和回归模型进行方差分析,结果见表3、4。

由表3可知,回归方程中的一次项 X_1 、 X_2 、 X_3 对 Y_1 的影响极显著($P < 0.01$), X_1 对 Y_2 的影响极显著($P < 0.01$), X_3 对 Y_2 的影响显著($P < 0.05$), 但 X_2 对 Y_2 的影响不显著($P > 0.05$); 回归方程中的二次项 X_1^2 、 X_2^2 对 Y_1 的影响极显著($P < 0.01$), X_3^2 对 Y_1 的影响显著($P < 0.05$), 且 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 对 Y_2 的影响极显著($P < 0.01$); 交互项 X_1X_2 对 Y_1 、 Y_2 及 X_2X_3 对 Y_2 的影响不显著($P > 0.05$), 但 X_1X_3 对 Y_1 、 Y_2 的影响极显著($P < 0.01$), X_2X_3 对 Y_1 的影响显著($P < 0.05$)。

表1 响应面设计因素及水平

Table 1 Factors and levels of response surface experiments design

| 水平 | X_1 加酶量/g | X_2 超声时间/min | X_3 超声功率/% |
|----|-------------|----------------|--------------|
| -1 | 0.04 | 30 | 80 |
| 0 | 0.05 | 40 | 90 |
| 1 | 0.06 | 50 | 100 |

由表4可知,回归模型的 $P < 0.01$, 说明二次回归方程模型极显著; Y_1 、 Y_2 的相关系数 R^2 分别为 0.988 5, 0.977 1, 表明藻红蛋白的得率和纯度实际值与预测值误差小; 调整相关系数 R_{Adj}^2 分别为 0.996 5, 0.947 6, 表明藻红蛋白得率和纯度的模型仅有 0.003 5, 0.002 4 不能用上述二次多元回归方程模拟; 且适合度缺项 $P > 0.05$ 为不显著, 进一步说明回归模型与实际情况拟合程度高。

表2 响应面设计实验方案及数据处理结果

Table 2 Design and results of response surface experiments

| 试验号 | X_1 | X_2 | X_3 | Y_1 得率/% | Y_2 纯度 |
|-----|-------|-------|-------|------------|----------|
| 1 | 1 | 1 | 0 | 1.475 | 0.412 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 1.811 | 0.466 |
| 3 | -1 | 0 | -1 | 1.501 | 0.428 |
| 4 | -1 | 1 | 0 | 1.368 | 0.408 |
| 5 | -1 | 0 | 1 | 1.687 | 0.382 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 1.818 | 0.468 |
| 7 | 0 | 1 | 1 | 1.611 | 0.398 |
| 8 | 1 | -1 | 0 | 1.511 | 0.411 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 1.799 | 0.460 |
| 10 | 1 | 0 | 1 | 1.745 | 0.438 |
| 11 | 0 | -1 | -1 | 1.528 | 0.410 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 1.803 | 0.459 |
| 13 | 0 | -1 | 1 | 1.688 | 0.388 |
| 14 | 0 | 1 | -1 | 1.497 | 0.401 |
| 15 | -1 | -1 | 0 | 1.433 | 0.399 |
| 16 | 1 | 0 | -1 | 1.677 | 0.429 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 1.808 | 0.469 |

表3 超声波协同酶解提取坛紫菜藻红蛋白得率和纯度系数的方差分析

Table 3 Analysis of variance of extraction rate and purity coefficients for phycoerythrin by ultrasound & hydrolysis methods from *Porphyra haitanensis*

| 模型项目 | 指标 | 系数评估 | 标准误差 | 方差和 | 均方差 | F 值 | P 值 |
|----------|-------|--------|-------|------------------------|------------------------|----------|----------|
| 常数项 | Y_1 | 1.810 | 0.004 | | | | |
| | Y_2 | 0.460 | 0.003 | | | | |
| X_1 | Y_1 | 0.052 | 0.003 | 0.022 | 0.022 | 269.01 | <0.000 1 |
| | Y_2 | 0.009 | 0.002 | 6.661×10^{-4} | 6.661×10^{-4} | 14.42 | 0.006 7 |
| X_2 | Y_1 | -0.026 | 0.003 | 0.005 | 0.005 | 66.93 | <0.000 1 |
| | Y_2 | 0.001 | 0.002 | 1.513×10^{-5} | 1.513×10^{-5} | 0.33 | 0.585 1 |
| X_3 | Y_1 | 0.066 | 0.003 | 0.035 | 0.035 | 427.17 | <0.000 1 |
| | Y_2 | -0.008 | 0.002 | 4.805×10^{-4} | 4.805×10^{-4} | 10.40 | 0.014 6 |
| X_1X_2 | Y_1 | 0.007 | 0.005 | 2.102×10^{-4} | 2.102×10^{-4} | 2.58 | 0.152 4 |
| | Y_2 | -0.002 | 0.003 | 1.600×10^{-5} | 1.600×10^{-5} | 0.35 | 0.574 7 |
| X_1X_3 | Y_1 | -0.030 | 0.005 | 0.003 | 0.003 | 42.67 | 0.000 3 |
| | Y_2 | 0.014 | 0.003 | 7.562×10^{-4} | 7.562×10^{-4} | 16.37 | 0.004 9 |
| X_2X_3 | Y_1 | -0.012 | 0.005 | 5.290×10^{-4} | 5.290×10^{-4} | 6.48 | 0.038 3 |
| | Y_2 | 0.005 | 0.003 | 9.025×10^{-5} | 9.025×10^{-5} | 1.95 | 0.204 9 |
| X_1^2 | Y_1 | -0.140 | 0.004 | 0.088 | 0.088 | 1 081.80 | <0.000 1 |
| | Y_2 | -0.018 | 0.003 | 0.001 | 0.001 | 31.02 | 0.000 8 |
| X_2^2 | Y_1 | -0.220 | 0.004 | 0.200 | 0.200 | 2 414.20 | <0.000 1 |
| | Y_2 | -0.038 | 0.003 | 0.006 | 0.006 | 134.72 | <0.000 1 |
| X_3^2 | Y_1 | -0.011 | 0.004 | 4.664×10^{-4} | 4.664×10^{-4} | 5.72 | 0.048 1 |
| | Y_2 | -0.027 | 0.003 | 0.003 | 0.003 | 64.96 | <0.000 1 |

表 4 回归模型的方差分析[†]

Table 4 Analysis of variance of regression model

| 来源 | 指标 | 方差和 | 自由度 | 均方差 | F 值 | P 值 | 显著性 |
|-------|----------------|------------------------|-----|------------------------|--------|----------|-----|
| 模型 | Y ₁ | 0.370 | 9 | 0.041 | 504.41 | <0.000 1 | *** |
| | Y ₂ | 0.014 | 9 | 0.002 | 33.17 | 0.006 7 | *** |
| 适合度缺损 | Y ₁ | 3.562×10 ⁻⁴ | 3 | 1.187×10 ⁻⁴ | 2.21 | 0.229 2 | |
| | Y ₂ | 2.382×10 ⁻⁴ | 3 | 7.942×10 ⁻⁵ | 3.73 | 0.118 0 | |
| 纯误差 | Y ₁ | 2.148×10 ⁻⁴ | 4 | 5.370×10 ⁻⁵ | | | |
| | Y ₂ | 8.520×10 ⁻⁵ | 4 | 2.130×10 ⁻⁵ | | | |
| 残差 | Y ₁ | 5.711×10 ⁻⁴ | 7 | 8.158×10 ⁻⁵ | | | |
| | Y ₂ | 3.234×10 ⁻⁴ | 7 | 4.621×10 ⁻⁵ | | | |
| 相关之和 | Y ₁ | 0.370 | 16 | | | | |
| | Y ₂ | 0.014 | 16 | | | | |

† *** 表示差异极显著(P<0.01); Y₁:R²=0.988 5,R_{Adj}²=0.996 5; Y₂:R²=0.977 1,R_{Adj}²=0.947 6。

2.6.3 响应面交互作用分析 响应面图可直观地体现各影响因子对项目指标的影响^[13]。由图 6、7 可知,超声波协同酶解提取坛紫菜藻红蛋白的影响因子对藻红蛋白得率和纯

度的影响不同。其中,图 6(a)和图 7(a)的响应面图曲面坡度平缓,等高线排列稀疏且趋于圆形,表示 X₁、X₂对 Y₁、Y₂的交互影响小;图 6(b)和图 7(b)的响应面图曲面坡度陡峭,

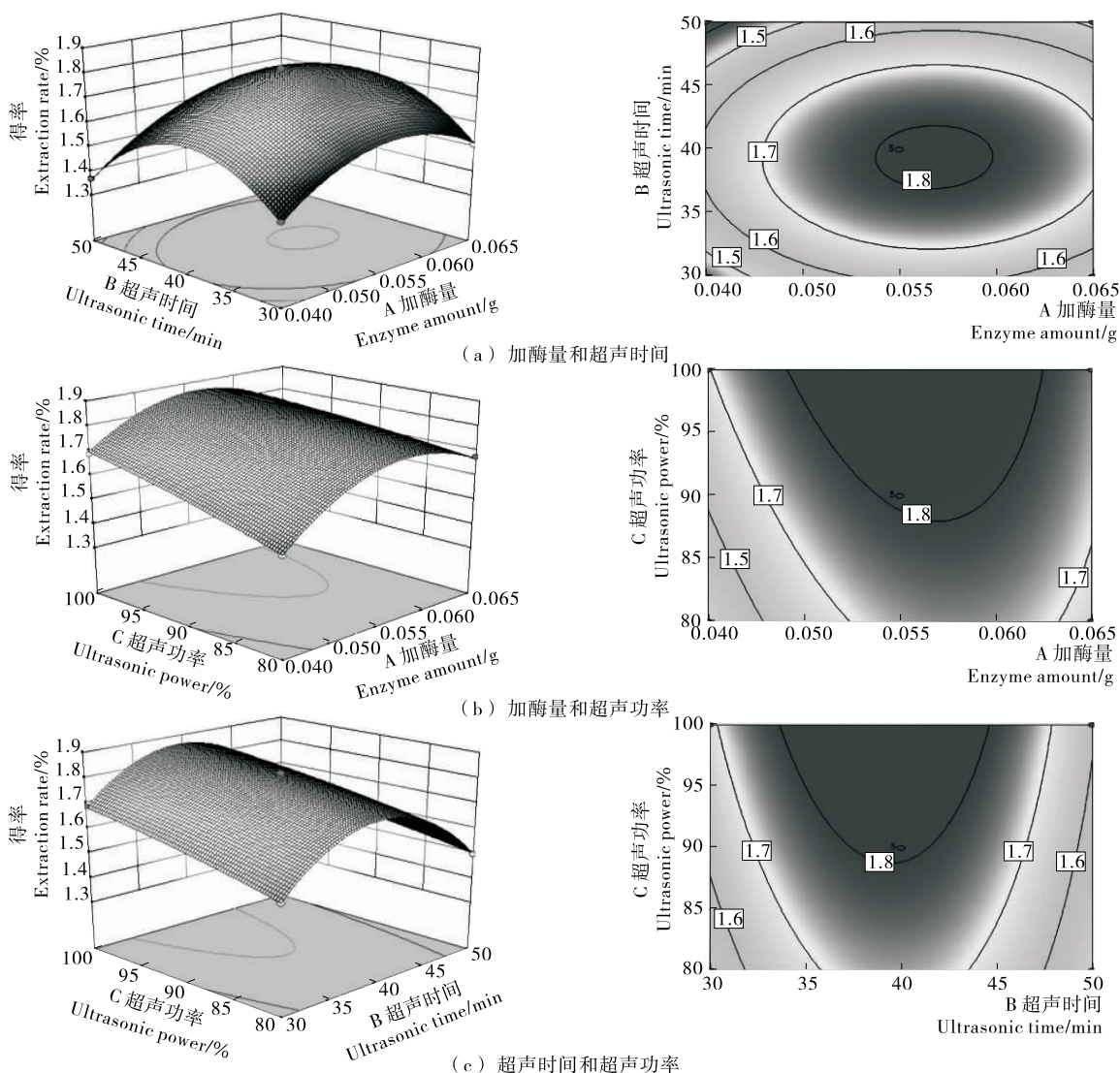


图 6 提取条件对坛紫菜藻红蛋白得率交互影响的曲面图及等高线图

Figure 6 Surface and contour plots mutual influence for the extraction conditions on the extraction rate of phycoerythrin from *Porphyra haitanensis*

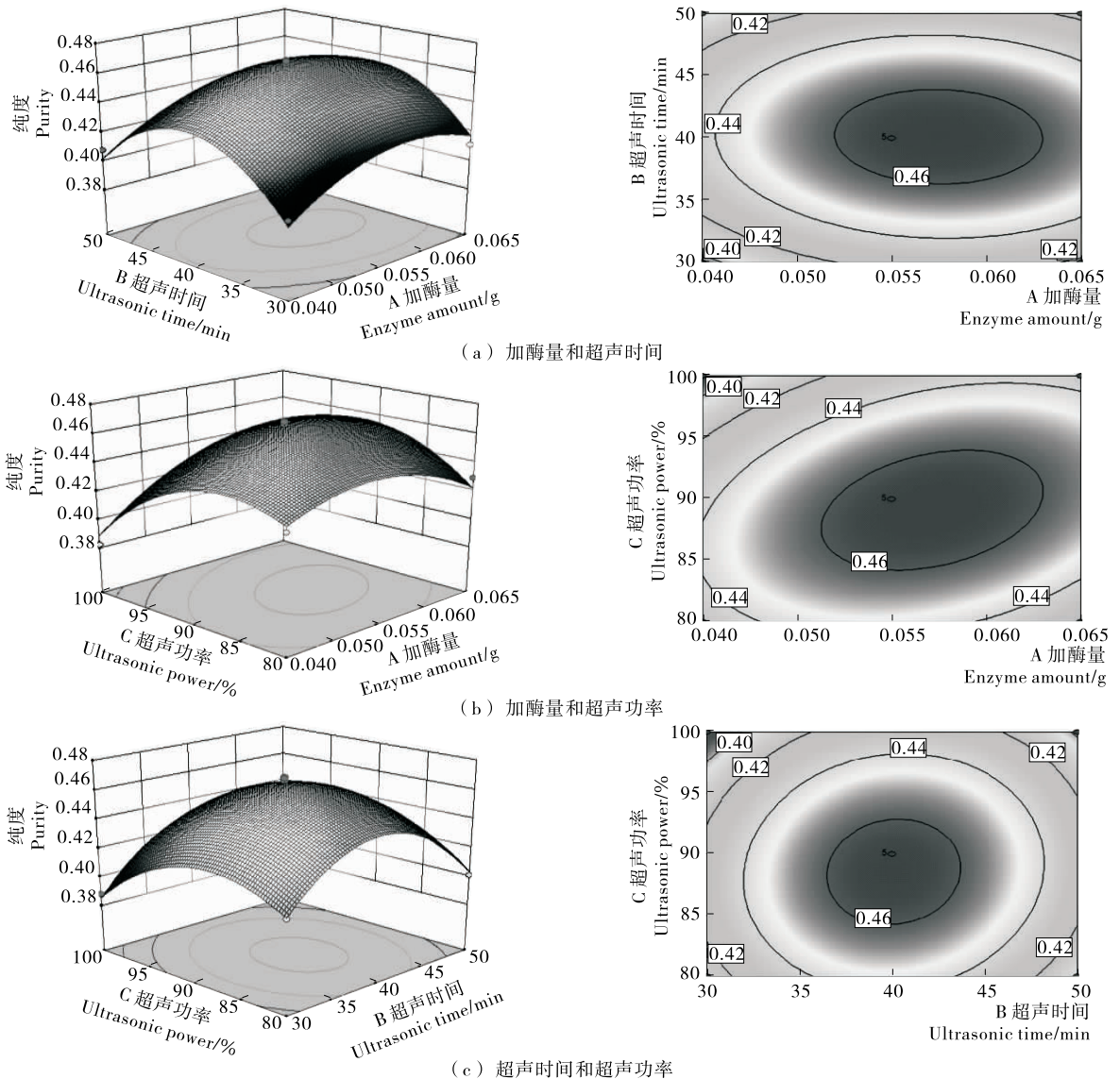


图7 提取条件对坛紫菜藻红蛋白纯度交互影响的曲面图及等高线图

Figure 7 Surface and contour plots mutual influence for the extraction conditions on the purity of phycoerythrin from *Porphyra haitanensis*

等高线排列紧密趋于椭圆形,说明 X_1 、 X_3 对 Y_1 、 Y_2 的交互影响大;图 6(c)和图 7(c)表明, X_2 和 X_3 对 Y_1 存在交互作用,但 X_2 、 X_3 对 Y_2 交互作用不显著。

2.6.4 提取参数优化及模型验证 通过采用 Box-Behnken 试验设计以及 Design-Expert 8.0 分析软件对藻红蛋白得率和纯度回归模型进行分析,得出超声波协同酶解提取坛紫菜藻红蛋白最优组合为:加酶量 0.05 g、超声时间 39.79 min、超声功率为额定功率的 91.07%(额定功率为 500 W);在此操作条件下,藻红蛋白的得率为 1.819%,纯度为 0.465。考虑实际操作的可行性,最优提取参数调整为:加酶量 0.05 g、超声时间 40 min、超声功率为额定功率的 90%,藻红蛋白理论得率为 1.810%,纯度为 0.460;在此条件下通过 3 次平行实验验证,得出藻红蛋白实际得率和纯度分别为 $(1.808 \pm 0.007)\%$ 和 0.460 ± 0.001 ,实际值与理论值相差极小。因此认为,本试验所建立的回归模型可较好预测坛紫菜藻红蛋白

的得率和纯度。

3 结论

通过试验优化得出超声波协同酶解提取坛紫菜藻红蛋白的最佳工艺参数为:pH 5.0、固液比 1:40 (g/mL),加酶量 0.05 g,超声时间 40 min,超声功率为额定功率的 90%;该条件下藻红蛋白的得率和纯度分别为 $(1.808 \pm 0.007)\%$ 和 0.460 ± 0.001 。在超声波协同纤维素酶酶解的双重作用下,可有效缩短坛紫菜藻红蛋白的提取时间,有利于大批量的工业化生产。但在采用超声波破壁的过程中,部分声能可转化为热能从而引起藻红蛋白提取液的温度升高,而且超声波的空穴作用,可能会导致藻红蛋白结构和生物活性发生变化。因此,在后续研究中,将借助傅里叶红外光谱、扫描电子显微镜观察以及化学分析等方法探讨超声波协同酶解对藻红蛋白结构和生物活性的影响。

(下转第 207 页)

- (3): 68-72.
- [27] 郝蕾. 浅谈转基因食品现状及其安全性[J]. 口岸卫生控制, 2016, 21(2): 28-30.
- [28] 成晓维, 王小玉, 胡松楠, 等. 可视芯片检测大豆、水稻和玉米中的转基因成分[J]. 现代食品科技, 2013, 29(3): 654-659.
- [29] BAI Su-lan, ZHANG Jie, LI Shu-cheng, et al. Detection of six genetically modified maize lines using optical thin-film biosensor chips[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2010, 58(15): 8 490-8 494.
- [30] 张占军, 王富花. 酶联免疫吸附技术及其在食品安全检测中的应用[J]. 食品研究与开发, 2011(1): 157-160.
- [31] 冯敏, 李亚楠, 高丽霞, 等. 酶联免疫吸附法在食品安全性指标检测中的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(10): 3 973-3 979.
- [32] 杨曙明, 于洪侠. 一种检测三聚氰胺的酶联免疫试剂盒: 中国, CN 101183105[P]. 2008-05-21.
- [33] 许艳丽, 鲍蕾, 吴振兴, 等. 免疫胶体金技术及其在真菌毒素检测中的应用[J]. 中国酿造, 2010(7): 13-17.
- [34] 刘晓玥, 侯亚楠, 吕丽卿. 饲料中黄曲霉毒素 B1 快速筛查胶体金免疫层析检测方法应用研究[J]. 吉林农业, 2017(18): 64-65.
- [35] 付林峰, 汪丽, 娄越, 等. 免疫金银染色法快速检测水产品中孔雀石绿残留的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(6): 2 146-2 153.
- [36] WANG J J, LIU B H, HSU Y T, et al. Sensitive competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip for detecting aflatoxin M1 in milk[J]. Food Control, 2011, 22(6): 964-969.
- [37] 伍燕华, 牛端江, 赖卫华, 等. 双抗夹心酶联免疫吸附法检测沙门氏菌[J]. 食品工业科技, 2014, 35(10): 62-65.
- [38] 谈超, 高爱华, 张燕, 等. 绿豆过敏原多克隆抗体制备及间接竞争酶联免疫检测方法的建立[J]. 中国食品学报, 2013, 13(7): 170-174.
- [39] 王新桐. 转基因棉花中新霉素磷酸转移酶(NPT II)双抗体夹心 ELISA 定量检测方法的建立[D]. 泰安: 山东农业大学, 2014: 12-33.
- [40] 金宇良. PCR 技术的研究进展[J]. 现代农业科技, 2012(10): 47-48.
- [41] 李凡, 许恒毅, 李福来. 多重 PCR 技术在食源性致病菌检测中应用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2015(21): 372-375.
- [42] KUBISTA M, ANDRADE J M, BENGTTSSON M, et al. The real-time polymerase chain reaction[J]. Molecular Aspects of Medicine, 2006, 27(2/3): 95-125.
- [43] 陈旭, 齐凤坤, 康立功, 等. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用[J]. 东北农业大学学报, 2010(8): 148-155.
- [44] WANG Yi, WANG Yan, ZHANG Lu, et al. Endonuclease restriction-mediated real-time polymerase chain reaction: A novel technique for rapid, sensitive and quantitative detection of nucleic-acid sequence[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, DOI: 10.3389/fmicb.2016.01104.
- [45] SARIMEHMETOGLU B, AKSOY M H, AYAZ N D, et al. Detection of Escherichia coli, O157:H7 in ground beef using immunomagnetic separation and multiplex PCR[J]. Food Control, 2009, 20(4): 357-361.
- [46] 赵洁, 马晨, 席晓敏, 等. 实时荧光定量 PCR 技术在肠道微生物领域中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2014(12): 61-66.
- [47] 董立明, 邢珍娟, 李葱葱, 等. 应用多重 PCR 技术快速筛查食品中的转基因成分[J]. 食品与生物技术学报, 2017(1): 56-61.
- [48] 邢珍娟, 董立明, 刘娜, 等. 应用直接 PCR 技术快速筛查转基因玉米方法研究[J]. 玉米科学, 2017(1): 29-33.

(上接第 161 页)

参考文献

- [1] MUNIER M, MORANCAIS M, DUMAY J, et al. One-step purification of R-phycoerythrin from the red edible seaweed *Grateloupia turuturu*[J]. Journal of Chromatography B, 2015, 992: 23-29.
- [2] 李春霞. 坛紫菜藻红蛋白规模制备、结构鉴定及体外抗肿瘤活性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.
- [3] 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.
- [4] DUMAY J, MORANCAIS M, MUNIER M, et al. Chapter eleven-phycoerythrins: valuable proteinic pigments in red seaweeds [J]. Advances in Botanical Research, 2014, 71: 321-343.
- [5] PANGESTUTI R, KIM S K. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae[J]. Journal of Functional Foods, 2011, 3: 255-266.
- [6] 施瑛, 裴斐, 周玲玉, 等. 响应面法优化复合酶法提取紫菜藻红蛋白工艺[J]. 食品科学, 2015, 36(6): 51-57.
- [7] 何思佳, 王洪新, 王远辉. 条斑紫菜藻红蛋白提取工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2011(11): 334-338.
- [8] DUMAY J, CLÉMENT N, MORANCAIS M, et al. Optimization of hydrolysis conditions of *Palmaria palmata* to enhance R-phycoerythrin extraction[J]. Bioresource Technology, 2013, 131: 21-27.
- [9] 蔡春尔, 李春霞, 藤一悦, 等. 条斑紫菜藻红蛋白粗提方法比较[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(3): 368-373.
- [10] SENTHILKUMAR N, SURESH V, THANGAM R, et al. Isolation and characterization of macromolecular protein R-Phycoerythrin from *Portieria hornemannii* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 55(8): 150-160.
- [11] 付复华, 袁洪燕, 潘兆平, 等. 黄桃超声波辅助酶法去皮工艺优化及其品质分析[J]. 食品与机械, 2016, 32(8): 182-187.
- [12] 孔祥佳, 连至楠. 杨梅清汁加工中的酶解工艺研究[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(12): 131-134.
- [13] 孔祥佳, 刘廉荣. 超声波乙醇浸提法提取橄榄叶总多酚工艺的研究[J]. 福建中医药, 2017, 48(2): 34-37.
- [14] 徐颖, 樊凡, 阴鹏涛, 等. 紫薯花青素超声波辅助酶法提取工艺优化及其抗氧化性研究[J]. 食品与机械, 2017, 33(3): 150-154.
- [15] 徐效圣, 潘俨, 傅力, 等. 响应面法优化水酶法提取核桃油的工艺条件[J]. 食品与机械, 2010, 26(2): 92-96.