

# 钝顶螺旋藻酶解条件的优化

谢倩<sup>1</sup>, 谢崔越<sup>2</sup>

(1. 山东省聊城第一中学, 山东聊城 252000; 2. 聊城市质量技术监督局鲁西质检中心, 山东聊城 252000)

**摘要** 以钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)为研究对象,运用蛋白酶SM98011酶解螺旋藻粗蛋白提取液,得到具有抗氧化活性的产物。结果表明,钝顶螺旋藻酶解的最优条件为加酶量1:15、酶解温度50℃,酶解时间5h。在此条件下,螺旋藻酶解产物的清除自由基能力为33.28%。

**关键词** 钝顶螺旋藻;酶解;清除自由基能力

**中图分类号** S986 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)04-0011-02

## Optimization of Enzymatic Hydrolysis Conditions for *Spirulina platensis*

XIE Qian<sup>1</sup>, XIE Cui-yue<sup>2</sup> (1. Liaocheng No. 1 High School, Liaocheng, Shandong 252000; 2. Luxi Quality Inspection Center of Liaocheng Bureau of Quality and Technical Supervision, Liaocheng, Shandong 252000)

**Abstract** Taking *Spirulina platensis* as research object, crude protein extract was hydrolyzed with protease SM98011 to obtain antioxidant substances. The results showed that the optimum conditions for enzymatic hydrolysis of *Spirulina platensis* were as follows: the addition quantity of 1:15, enzymatic hydrolysis at 50℃ for 5 h. Under these conditions, the scavenging capability of enzymatic hydrolysate of *Spirulina platensis* to free radicals was 33.28%.

**Key words** *Spirulina platensis*; Enzymatic hydrolysis; Scavenging capability to free radicals

近年来,抗衰老研究已成为研究热点之一<sup>[1]</sup>。研究表明,增加蔬菜与水果的摄入量可以提高对一些癌症的抵抗力,主要是因为其富含清除自由基的物质<sup>[2-4]</sup>。据报道,一些藻类可以阻止或预防自由基与活性氧造成的机体损伤,阻止癌细胞形成以及其他损害的发生<sup>[5]</sup>。此外,有学者从海洋藻类中提取出具有抗氧化和抗癌功能的多糖<sup>[6]</sup>。Hu等<sup>[7]</sup>研究表明,从黑角菜属的海藻和昆布属等植物中提取的硫酸盐多糖具有较高的清除自由基活性。从红藻门植物中提取的金属卟啉类物质可以通过增加小鼠体内抗氧化酶的含量,来消除脂质过氧化作用,从而达到延缓衰老的目的<sup>[8]</sup>。

藻类产品是一种均衡、无害、自然的产品,被广泛应用于食品以及生命科学研究中<sup>[9-10]</sup>。海洋藻类品种的多样性为新药品的研究提供了多种原料<sup>[11-12]</sup>。海洋中存在大量的蛋白质资源,但很少有关于藻类水解蛋白的应用报道<sup>[13-15]</sup>。海洋资源具有广阔的发展空间,关于新的海洋产品复合物在未来的医学研究中具有很大的潜力<sup>[16]</sup>。目前,有多种从藻类中提取生物活性物质的方法,而水解法具有其他方法所不可比拟的优点,不需要任何有毒的化学药品。酶解提取出的物质比水提和有机溶剂提取的物质具有更高的活性<sup>[17]</sup>。

螺旋藻具有特殊的细胞壁结构,因其细胞形态呈螺旋状而得名,易于水解,目前已有许多关于螺旋藻酶解反应的报道。螺旋藻中含有极为丰富的营养元素,甚至比日常食用的植物类和动物类食品的营养更加丰富,可作为地球上丰富的营养源。螺旋藻除了可作为营养丰富的食品外,在螺旋藻的水解产物中还提取出具有降血压、抗艾滋、抗氧化等的活性物质,可增强机体抵抗力,在一定程度上替代合成药品,用于治疗人类多种疾病。笔者运用山东大学生命科学院微生物实验室发现并保存的 *Bacillus* sp. SM98011 菌株发酵产生

的蛋白酶酶解钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*),探讨钝顶螺旋藻酶解的优化条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料和菌株

**1.1.1 试验材料。**钝顶螺旋藻由山东大学生命科学院微生物实验室培养,将螺旋藻藻液按约1:1的比例与培养基混合,放入5000 mL玻璃瓶中置于光照培养箱中,白炽灯照明,每天通气约12 h,温度控制在28℃左右。培养7~8 d后对处于对数生长期的成熟螺旋藻进行收集。此外,也可不对螺旋藻培养基通气,培养21~28 d后对成熟螺旋藻进行收集。清洗后,于-20℃下保存。

**1.1.2 试验菌株。**试验菌株为山东大学生命科学院微生物实验室收藏菌株 *Bacillus* sp. SM98011,经发酵后产蛋白酶,经测定其催化活力为4000 U/mL,可用于酶解反应<sup>[18]</sup>。

**1.2 试剂与药品** α-脱氧核糖(Sigma公司);FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、NaHCO<sub>3</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、NaCl、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>、硫代巴比妥酸、三氯乙酸等均为国产分析纯。

**1.3 仪器** 高速冷冻离心机,由Eppendorff公司生产;722分光光度计,由上海精密科学仪器有限公司生产;分光光度计GeneQuant100,由美国GE公司生产;多用途水浴恒温振荡器DSHZ-3000,由上海亚荣生化仪器厂生产。

### 1.4 方法

**1.4.1 钝顶螺旋藻的养殖。**螺旋藻培养基采用Zarrouk培养基配方配制:NaHCO<sub>3</sub> 16.80 g/L、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.50 g/L、NaNO<sub>3</sub> 2.50 g/L、NaCl 1.00 g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.20 g/L、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g/L、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.00 g/L、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.04 g/L、ED-TA 0.08 g/L。将钝顶螺旋藻藻种接种至培养基,置于光照培养箱中,每天通气12 h,用白炽灯照光,温度控制在(28±2)℃。培养7~8 d,于对数生长期进行螺旋藻收集。收集螺旋藻后,用流动的蒸馏水清洗干净,于-20℃下保存,备用。

**1.4.2 钝顶螺旋藻粗蛋白的提取。**螺旋藻收集后,与浓度

**作者简介** 谢倩(1986—),女,山东聊城人,中教一级,硕士,从事螺旋藻的相关研究。

**收稿日期** 2016-12-09

20 mmol/L 的磷酸缓冲液 (pH 7.0) 混合并稀释至适当浓度, 反复冻融, 以利于蛋白质的释放。将蛋白液于 4 °C 下 11 000 r/min 离心 20 min, 上清液即为螺旋藻粗蛋白液, 于 4 °C 下保存, 备用。

**1.4.3 蛋白酶 SM98011 的培养。**斜面培养基: 蛋白胨 1.00%, 酵母粉 0.30%, 葡萄糖 1.00%, 琼脂 1.60%, pH 7.2~7.5。液体发酵产酶培养基: 玉米粉 2.00%, 麸皮 1.00%, 豆粕 2.00%, NaHPO<sub>4</sub> 0.10%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.03%, CaCl<sub>2</sub> 0.10%, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.10%, pH 7.5, 装液量 50 mL/500 mL 三角瓶<sup>[19]</sup>。

蛋白酶 SM98011 的制备: 将 *Bacillus* sp. SM98011 接种于液体发酵产酶培养基, 在 32 °C、120 r/min 条件下培养约 36 h, 确保通气量。将产酶发酵液在 4 °C、11 000 r/min 离心 10 min, 取上清液于 4 °C 下保存, 备用。

**1.4.4 藻蛋白酶解条件的优化。**将冻融后经过离心的螺旋藻粗蛋白各取 45 mL 装入 500 mL 三角瓶中, 按 1:5、1:10、1:15、1:20 的比例分别加入 20 mmol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液 (设为酶解对照) 以及 SM98011 蛋白酶液, 混匀后置于 50 °C 水浴摇床中, 设转速为 90 r/min, 分别混匀酶解, 于酶解 2、3、4、5、6 h 后分别取样, 迅速将样品置于 90 °C 水浴锅中, 保温 10~15 min, 使酶灭活。将酶解产物在 4 °C、11 000 r/min 离心 20 min, 得到的上清液即为酶解液, 弃去大颗粒沉淀, 收集上清液, 于 -20 °C 下保存, 备用。

**1.4.5 清除羟基自由基能力的测定。**采用  $\alpha$ -脱氧核糖法<sup>[20-21]</sup> 测定不同酶解时间钝顶螺旋藻的清除自由基能力。将 FeSO<sub>4</sub> 制成母液, 同时将 EDTA 制成高浓度母液, 将二者混合成浓度 10 mmol/L 的 FeSO<sub>4</sub>-EDTA, 并加入少量的还原铁粉, 以防止 FeSO<sub>4</sub> 被氧化。取 0.2 mL 的 10 mmol/L FeSO<sub>4</sub>-EDTA 溶液置于具塞试管中, 加入 0.2 mL 的  $\alpha$ -脱氧核糖溶液 (浓度 20 mmol/L), 然后加入 0.2 mL 测试样品 (不同时间的酶解液样品、未酶解样品), 用 pH 7.4、20 mmol/L 磷酸缓冲液将溶液定容至 1.8 mL, 再加入 0.2 mL 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mmol/L), 混匀, 将各试管置于 37 °C 水浴锅中保温 1 h。然后, 在各试管内加入 1.0 mL 2.8% 三氯乙酸溶液终止反应, 再加入 1.0 mL 1% 的硫代巴比妥酸溶液, 将溶液混匀后在沸水浴中加热 10 min 后显色, 将溶液自然冷却后 (1 h 内) 于 532 nm 处测定吸光值 (A<sub>s</sub>)。不加样品, 以缓冲液或三蒸水代替测试样品, 作为对照, 进行相同操作处理, 测定其对比吸光值 (A<sub>c</sub>)。按照以下公式计算样品的自由基清除能力 (SA, 单位 %): SA = (A<sub>c</sub> - A<sub>s</sub>) / A<sub>c</sub> × 100%。

## 2 结果与分析

蛋白酶 SM98011 是由山东大学生命科学学院微生物实验室提取发现的, 并多次加以利用, 在以前的报道中应用 SM98011 发酵产蛋白酶的适宜酶解温度约为 50 °C, 其酶解样品时反应温度在 50 °C 左右<sup>[18,22]</sup>, 所以选取 50 °C 作为该试验中酶解温度。运用  $\alpha$ -脱氧核糖法测定不同酶解时间钝顶螺旋藻的抗氧化活性, 结果发现不同加酶量及不同酶解时间钝顶螺旋藻的清除自由基能力比未经酶解的对照样品强, 而当加酶量为 1:15 时, 酶解 5 h 的酶解液与其他样品相比表

现出更高的抗氧化活性, 约为 33.28% (图 1)。由此可见, 钝顶螺旋藻的最优酶解条件为: 酶解温度 50 °C, 蛋白酶 SM98011 的加酶量为 1:15, 酶解时间 5 h。

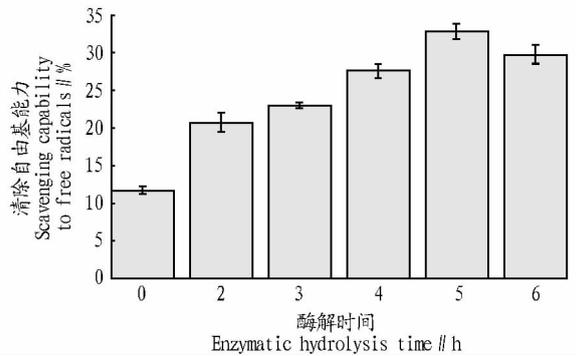


图 1 蛋白酶 SM98011 酶解螺旋藻样品在不同酶解时间的清除羟基自由基能力比较

Fig. 1 The scavenging capability comparison of *Spirulina platensis* hydrolyzed with protease SM98011 at different time to free radicals

## 3 讨论

螺旋藻是研究较多的一种高价值藻类, 研究报道主要集中在其降血压活性以及其作为自然食品所具有的丰富营养, 而关于从螺旋藻粗蛋白的酶解液中提取抗氧化活性物质的报道较少。笔者对钝顶螺旋藻粗蛋白酶解液的清除自由基能力进行了测定。

钝顶螺旋藻经多次冻融提取粗蛋白后, 用蛋白酶 SM98011 对其进行酶解。据报道, 运用 SM98011 发酵产的蛋白酶酶解样品时所用的反应温度在 50 °C 左右<sup>[18,22]</sup>, 因此该试验中用 50 °C 作为酶解反应温度, 将螺旋藻在酶解时间分别设为 2、3、4、5、6 h, 采用  $\alpha$ -脱氧核糖法检测其抗氧化活性。结果发现, 酶解 2~6 h 钝顶螺旋藻的清除自由基能力呈现上升趋势, 分别为 20.9%、23.5%、27.8%、33.2%、28.7%, 均高于未酶解样品。由此可见, 酶解有利于促进螺旋藻样品中具有抗氧化活性物质的释放。随着酶解时间的延长, 钝顶螺旋藻的清除自由基能力呈现先递增后减小的趋势, 因此, 确定钝顶螺旋藻的适宜酶解时间对螺旋藻中抗氧化物质的提取具有较大的影响。

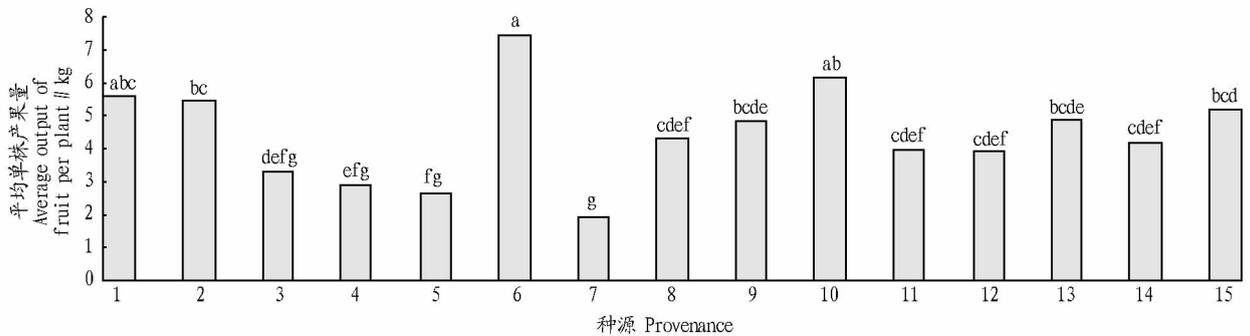
## 参考文献

- [1] SCHÜRER P D N Y. Anti-aging[J]. Der hautarzt, 2003, 54(9): 833-838.
- [2] SINGH N, RAJINI P S. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel[J]. Food chemistry, 2004, 85(4): 611-616.
- [3] CHU Y F, SUN J, WU X Z, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2002, 50(23): 6910-6916.
- [4] COOKE M S, EVANS M D, MISTRY N, et al. Role of dietary antioxidants in the prevention of *in vivo* oxidative DNA damage[J]. Nutrition research reviews, 2002, 15(1): 19-41.
- [5] SHEIH I C, FANG T J, WU T K. Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste[J]. Food chemistry, 2009, 115(1): 279-284.
- [6] RUPE'REZ P, AHRAZEM O, LEAL J A. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*[J]. Journal of agriculture food chemistry, 2002, 50(4): 840-845.

(下转第 15 页)

量见图 1。由图 1 可知,在 15 个种源中,各种源间存在一定差异,种源 6 平均单株产果量最高,单株产果达 7.46 kg,与种源 1、种源 10 无显著差异,但显著高于其他种源;种源 1 与种源 10 平均单株产果量分别为 5.59、6.18 kg;其次是种源 2 与

种源 15,其平均单株产果量分别为 5.44、5.20 kg,与其他种源间均存在一定差异,与种源 4、种源 5、种源 7 存在显著差异,种源 7 平均单株产果量最低,仅为 1.93 kg。



注:不同小写字母表示不同种源间差异显著( $P < 0.05$ )

Note: Different lowercases stand for significant difference between different provenances at 0.05 level

图 1 2012—2015 年 15 个油茶种源的平均单株产果量

Fig. 1 Average output of fruit of fifteen provenances in 2012 – 2015

### 3 结论与讨论

(1) 从平均单株产果量看,各种源存在显著差异,部分种源间差异不显著。在 15 个种源中,岑软油茶的平均单株产果量为 7.46 kg,显著高于其他种源,体现了其丰产性;其次是龙胜毛茶、常山霜降籽、衡东大桃、安徽大红,其平均单株产果量分别为 6.18、5.59、5.44、5.20 kg,而其他种源的平均单株产果量较低,不适宜在桂林地区种植。

(2) 在桂林油茶产区发展油茶生产宜采用岑软油茶、龙胜毛茶、常山霜降籽、衡东大桃等油茶种源;在选择种源后,要使其达到丰产稳产,必须根据各种源的生长特性,加强抚育、施肥与病虫害防治等科学管理工作,促进油茶植株旺盛生长。

(3) 在油茶生产发展中除种源选择外,种源中的良种筛选很重要,要使油茶丰产林达到早实、丰产、高效,必须选用早实、丰产、稳产的良种;同时在选择油茶造林地时要考虑交通方便、土壤深厚、排水良好、光照条件好、坡度较缓的地区。

### 参考文献

- [1] 庄朱辉. 油茶扦插育苗实验研究[J]. 福建林业科技, 2003, 30(3): 83–85.
- [2] 马英玲, 韦春义, 林红兵. 油茶幼苗根腐病病原及防效研究[J]. 广东农业科学, 2013(19): 70–71.
- [3] 雷治国, 黄永芳, 何会蓉. 油茶及其种质资源研究进展[J]. 经济林研究, 2003, 21(4): 123–125.
- [4] 黄永芳, 陈红跃, 雷治国, 等. 广东省油茶生产状况与发展对策[J]. 经济林研究, 2004, 22(3): 77–79.
- [5] 庄瑞林. 中国油茶[M]. 2 版. 北京: 中国林业出版社, 2008: 51.
- [6] 黄富才. 油茶栽培技术[J]. 现代农业科技, 2009(16): 49.
- [7] HU J F, GENG M Y, ZHANG J T, et al. An *in vitro* study of the structure-activity relationships of sulfated polysaccharide from brown algae to its antioxidant effect[J]. Journal of asian natural product reports, 2001, 3(4): 353–358.
- [8] ZHANG Q B, LI N, ZHOU G F, et al. *In vivo* antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta) in aging mice [J]. Pharmacological research, 2002, 48(2): 151–155.
- [9] BOOTH E. Trace elements and seaweeds [C]//DE VIRVILLE A D, FELDMANN J. Proceeding of the 4th International seaweed symposium. New York: Pergamon Press, 1964: 385–393.
- [10] MUNRO M H G, LUIBRAND R T, BLUNT J W. The search for antiviral and anticancer compounds from marine organisms[J]. Bioorganic marine chemistry, 1987(1): 93–176.
- [11] MUNRO M H G, BLUNT J W, DUMDEI E J, et al. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential[J]. Journal of biotechnology, 1999, 70(1/2/3): 15–25.
- [12] ATHUKORALA Y, JUNG W K, VASANTHAN T, et al. An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*[J]. Carbohydrate polymers, 2006, 66(2): 184–191.
- [13] SATO M, HOSKAWA T, YAMAGUCHI T, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from wakame (*Undaria pinnatifida*) and their antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats[J]. Journal agriculture food chemistry, 2002, 50(21): 6245–6252.
- [14] SUETSUNA K, CHEN J R. Identification of antihypertensive peptides from peptic digest of two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* [J]. Marine biotechnology, 2001, 3(4): 305–309.
- [15] SUETSUNA K, NAKANO T. Identification of an antihypertensive peptide from peptic digest of wakame (*Undaria pinnatifida*) [J]. Journal of nutrition and biochemistry, 2000, 11(9): 450–454.
- [16] MAYER A M S, GUSTAFSON K R. Marine pharmacology in 2003–2004. Anti-tumor and cytotoxic compounds [J]. European journal of cancer, 2006, 42(14): 2241–2270.
- [17] HEO S J, PARK E J, LEE K W, et al. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds[J]. Bioresource technology, 2005, 96(14): 1613–1623.
- [18] HE H L, CHEN X L, LI J W, et al. Taste improvement of refrigerated meat treated with cold-adapted protease [J]. Food chemistry, 2004, 84(2): 307–311.
- [19] 张树政. 酶制剂工业(上)[M]. 北京: 科学教育出版社, 1998.
- [20] UCHIYAMA M, MIHARA M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test [J]. Analytical biochemistry, 1978, 86(1): 271–278.
- [21] PI NERO ESTRADA J E, BERMEJO B P, VILLAR DEL FRNSNO A M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract [J]. Il farmaco, 2001, 56(5/6/7): 497–500.
- [22] 师晓栋, 何海伦, 王运涛, 等. 酶法进行海洋低值蛋白资源高值化利用初探[J]. 海洋科学, 2001, 25(3): 4–7.

(上接第 12 页)