

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学 号: 20620111151479

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

螺旋藻光合产藻蓝蛋白及萃取条件的优化

Optimization of C-phycoyanin Photoproduction in
Spirulina platensis and Extraction Conditions

金怡雯

指导教师姓名: 卢英华 教 授

敬科举 助理教授

专业名称: 化 学 工 程

论文提交日期: 2 0 1 4 年 月

论文答辩日期: 2 0 1 4 年 月

学位授予日期: 2 0 1 4 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2014 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

近年来,随着海洋生物学研究的不断深入,发现了许多海洋生物尤其是大量藻类具有特殊的药用和营养价值。其中螺旋藻 (*Spinulina platensis*) 中的藻蓝蛋白 (C-phycoyanin, C-PC) 以其特有的营养和保健价值受到广泛的重视。藻蓝蛋白具有水溶性好、无毒且着色力强等优点,因而被广泛用于食品着色剂和化妆品添加剂,另外藻蓝蛋白具有抗氧化、抗突变、抗肿瘤、抗病毒、增强免疫力、清除自由基、保肝、降血脂等功效,这为螺旋藻在功能性食品和药品领域的应用开发提供了依据。

本文以螺旋藻为研究对象,首先设计了一个性能优良的光生物反应器,选用 Zarrouk 培养基,在初始培养条件:氮源为 30 mM 硝酸钠,碳源为 2.5% CO₂ (流速为 0.2 vvm),温度为 28°C 的基础上考察了不同光照强度和接种量对螺旋藻生长及藻蓝蛋白产率的影响。确定了优化的操作条件为光照强度 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$,接种量 0.24 g/L,此时螺旋藻的生物量和藻蓝蛋白产率分别达到 576.3 mg/L/d 和 77.4 mg/L/d。

在确定最适光强为 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 之后,为了防止生长后期由于光遮蔽引起的藻细胞生长速率下降,根据细胞生长的情况,采取逐步提升光照强度的策略;又为了进一步提高藻蓝蛋白产量,采取补料分批培养 (Fed-batch) 的策略对该株螺旋藻进行培养。结果显示,逐步提升光照强度策略可有效促进藻体生长,将生物量产率从 576.3 mg/L/d 提升到 709.4 mg/L/d,但藻蓝蛋白得率会有所下降;而补料分批培养策略可有效的提高藻蓝蛋白得率,本文比较了流加不同成分(培养基或单一氮源)和不同浓度的氮源(5 mM 或 10 mM)对藻蓝蛋白产率的影响。结果显示,当流加含有 5 mM 硝酸盐的培养基时,藻蓝蛋白产率最高,达到 94.8 mg/L/d,较批次培养提高了 22.5%。

最后,对藻蓝蛋白的萃取分离进行了研究。在单因素试验的基础上,选取料液比、萃取时间和萃取温度三个因素进行 Box-Behnken 响应面设计,利用 Design Expert 8.0.6 软件进行回归拟合,优化藻蓝蛋白的萃取工艺。得到最佳工艺条件为:料液比 2.0 mg/mL、萃取时间 37.1 h 和萃取温度 25.6°C,计算得到的理论最

大得率为 13.72%，验证实验得率为 13.66%，较优化前提高了 32.8%。

本文确定了螺旋藻最适培养工艺和藻蓝蛋白萃取分离方法，大幅度提升了螺旋藻生物量和藻蓝蛋白产率，对其工业化生产具有重要的指导意义！

关键词：螺旋藻；藻蓝蛋白；光照强度；补料分批；萃取

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

In recent years, many marine organisms, especially a lot of algae were found with the intensive study of marine biology. Blue-green algae *Spirulina platensis* is gaining more and more attentions as a nutraceutical and source of potential pharmaceuticals. The biological and pharmaceutical properties of *Spirulina* sp. were mainly attributed to C-phycoerythrin (C-PE). C-phycoerythrin, a non-toxic water-soluble fluorescent protein pigment, is one of the major components of *Spirulina platensis*. Some studies have demonstrated the antioxidant, antimutagenic, antiviral, anticancer, anti-allergic, immune enhancing, hepato-protective, blood vessel relaxing and blood lipid-lowering effects of C-phycoerythrin.

The initial culture conditions were described as follows: nitrogen source 30 mM NaNO₃, carbon source 2.5% CO₂ (flow rate 0.2 vvm) and temperature 28°C. Basing on a good performing photobioreactor and the Zarrouk medium, the effects of different light intensity and inoculum size on cell growth and C-phycoerythrin photoproduction of *Spirulina platensis* were investigated. The results showed that the optimal light intensity was 300 μmol/m²/s and the optimal inoculum size was 0.24 g/L. Under this condition, the biomass productivity reached 576.3 mg/L/d and the C-phycoerythrin productivity reached 77.4 mg/L/d respectively.

Secondly, two strategies were used to culture the microalgae after the determination of the optimum light intensity and inoculum size. The stepwise increasing light intensity strategy could be effective in promoting cell growth of the microalgae, raising the biomass productivity from 576.3 mg/L/d to 709.4 mg/L/d. However, this culture strategy would reduce the C-phycoerythrin content in the last phase of fermentation, the fed-batch strategy could improve it effectively. Different components (nitrate or medium) and different concentration (5 mM or 10 mM) of the nitrogen were feeding in culture process. When feeding the medium of the same

concentration with 5 mM nitrate, the highest C-phycoerythrin productivity reached 94.8 mg/L/d and increased 22.5% in comparison with the batch culture.

Finally, on the basis of single factor test, the Box-Behnken response surface design and the Design Expert 8.0.6 software were utilized to optimize the extraction process of C-phycoerythrin. The results of the optimization were described as follows: solid-to-liquid ratio 2.0 mg/mL, extraction time 37.1 h and extraction temperature 25.6°C. The extraction yield of C-phycoerythrin was 13.66% under the optimal conditions, which was about 32.8% higher than that of non-optimized conditions and perfectly matched the predicted value (13.72%).

This article greatly enhanced the cell growth and C-phycoerythrin photoproduction of *Spirulina platensis* and provided a guidance for its industrial production.

Key words: *Spirulina platensis*; C-phycoerythrin (C-PC); Light intensity; Fed-batch; Extraction

目录

第一章 文献综述	1
1.1 藻蓝蛋白概述	1
1.1.1 藻胆蛋白概述.....	1
1.1.2 藻蓝蛋白的理化性质.....	3
1.1.3 藻蓝蛋白的生物学活性.....	4
1.1.4 藻蓝蛋白产品的研究及开发应用前景.....	7
1.2 微藻概述	8
1.2.1 螺旋藻概述.....	9
1.2.2 螺旋藻国内外研究进展.....	11
1.2.3 能源微藻的开发利用.....	13
1.3 螺旋藻光合产藻蓝蛋白的培养工艺	14
1.3.1 光生物反应器.....	14
1.3.2 培养基.....	15
1.3.3 光照强度.....	17
1.3.4 接种量.....	18
1.3.5 培养策略.....	18
1.4 藻蓝蛋白的萃取分离	20
1.4.1 反复冻融法.....	20
1.4.2 化学试剂处理法.....	21
1.4.3 直接渗透压法.....	21
1.4.4 超声波法.....	21
1.5 本课题的研究内容及研究意义	21
第二章 材料与方法	23
2.1 实验材料	23
2.1.1 藻种.....	23
2.1.2 实验试剂.....	23

2.1.3 实验仪器.....	25
2.2 实验方法.....	25
2.2.1 培养基.....	25
2.2.2 光生物反应器.....	25
2.2.3 分批培养.....	26
2.2.4 不同光照强度.....	26
2.2.5 不同接种量.....	26
2.2.6 逐步提升光照强度.....	27
2.2.7 补料分批培养.....	27
2.3 分析方法.....	27
2.3.1 藻体生物量的测定.....	27
2.3.2 藻体比生长速率和生物量产率的测定.....	29
2.3.3 藻体 CO ₂ 固定速率的测定.....	29
2.3.4 光照强度的测定.....	29
2.3.5 藻体光合作用效率的测定.....	29
2.3.6 硝酸钠浓度的测定.....	30
2.3.7 藻蓝蛋白含量的测定.....	31
第三章 螺旋藻培养条件的优化及藻蓝蛋白含量的分析.....	33
3.1 螺旋藻生长和光合产藻蓝蛋白的过程.....	33
3.1.1 藻细胞的生长.....	34
3.1.2 氮源的消耗.....	34
3.1.3 藻蓝蛋白的合成.....	34
3.2 光照强度对螺旋藻生长及光合产藻蓝蛋白的影响.....	35
3.2.1 光照强度对藻细胞生长的影响.....	35
3.2.2 光照强度对氮源消耗的影响.....	37
3.2.3 光照强度对螺旋藻光合产藻蓝蛋白的影响.....	38
3.3 接种量对螺旋藻生长及光合产藻蓝蛋白的影响.....	40
3.3.1 接种量对藻细胞生长的影响.....	41
3.3.2 接种量对氮源消耗的影响.....	42

3.3.3 接种量对螺旋藻光合产藻蓝蛋白的影响.....	43
3.4 逐步提升光照强度对螺旋藻生长及藻蓝蛋白合成的影响	44
3.4.1 逐步提升光照强度对藻细胞生长的影响.....	45
3.4.2 逐步提升光照强度对氮源消耗的影响.....	44
3.4.3 逐步提升光照强度对螺旋藻光合产藻蓝蛋白的影响.....	45
3.5 补料分批培养对螺旋藻生长及藻蓝蛋白合成的影响	46
3.5.1 补料分批培养对藻细胞生长的影响.....	51
3.5.2 补料分批培养对氮源消耗的影响.....	52
3.5.3 补料分批培养对螺旋藻光合产藻蓝蛋白的影响.....	52
3.6 两种培养策略的比较	53
3.7 本章小结	53
第四章 螺旋藻藻蓝蛋白萃取条件的响应面优化.....	54
4.1 单因素试验	54
4.1.1 萃取时间对藻蓝蛋白得率的影响.....	54
4.1.2 萃取温度对藻蓝蛋白得率的影响.....	55
4.1.3 料液比对藻蓝蛋白得率的影响.....	55
4.2 响应面法优化	56
4.2.1 响应面试验设计.....	56
4.2.2 试验设计及结果.....	57
4.2.3 响应面结果分析.....	58
4.2.4 各因素之间的交互作用.....	59
4.2.5 优化工艺结果.....	63
4.3 本章小结	64
第五章 结论与展望	65
5.1 结论	65
5.2 展望	66
参考文献	67
硕士在读期间发表论文	77

致谢.....78

厦门大学博硕士论文摘要库

CONTENTS

Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Overview of C-phycoyanin.....	1
1.1.1 Overview of phycobiliprotein.....	1
1.1.2 Physical and chemical properties of C-phycoyanin.....	3
1.1.3 Biological activity of C-phycoyanin.....	5
1.1.4 Research and development prospects of C-phycoyanin products.....	7
1.2 Overview of microalgae.....	8
1.2.1 Overview of <i>Spirulina platensis</i>	9
1.2.2 Domestic and abroad research progresses of <i>Spirulina platensis</i>	11
1.2.3 Development and utilization of energy microalgae.....	13
1.3 The influencing factors on C-phycoyanin photosynthetic synthesis from <i>Spirulina platensis</i>.....	15
1.3.1 Photobioreactor.....	15
1.3.2 Medium.....	16
1.3.3 Light intensity.....	17
1.3.4 Inoculum size.....	18
1.3.5 Cultivation strategy.....	18
1.4 Extraction methods of C-phycoyanin.....	21
1.4.1 Freeze thaw method.....	21
1.4.2 Chemical reagent treatment method.....	21
1.4.3 Direct osmotic pressure method.....	21
1.4.4 Ultrasonic method.....	22
1.5 Contents and purpose of the thesis.....	22
Chapter 2 Materials and methods.....	24
2.1 Experimental Materials.....	24
2.1.1 Algae.....	24
2.1.2 Experimental reagents.....	24
2.1.3 Experimental facilities.....	25

2.2 Experimental method	26
2.2.1 Medium	26
2.2.2 Photobioreactor	26
2.2.3 Batch culture	27
2.2.4 Different light intensity	27
2.2.5 Different inoculum size	27
2.2.6 Stepwise increasing light intensity	28
2.2.7 Fed-batch	28
2.3 Analysis method	28
2.3.1 Calculation of algae biomass concentration	28
2.3.2 Calculation of growth rate and biomass productivity	30
2.3.3 Calculation of CO ₂ fixation rate	30
2.3.4 Calculation of light intensity	30
2.3.5 Calculation of algae photosynthesis efficiency	30
2.3.6 Calculation of nitrate concentration	31
2.3.7 Calculation of C-phycoerythrin content	32
Chapter 3 Optimization of cultivation conditions of <i>Spirulina platensis</i> and analysis of C-phycoerythrin content	34
3.1 Time-course performance on cell growth and C-phycoerythrin photoproduction of <i>Spirulina platensis</i>	34
3.1.1 The cell growth of <i>Spirulina platensis</i>	35
3.1.2 The consumption of nitrogen source	35
3.1.3 The synthesis of C-phycoerythrin	35
3.2 Effects of light intensity on cell growth and C-phycoerythrin photoproduction of <i>Spirulina platensis</i>	36
3.2.1 Effects of light intensity on cell growth of <i>Spirulina platensis</i>	36
3.2.2 Effects of light intensity on consumption of nitrogen source	38
3.2.3 Effects of light intensity on C-phycoerythrin photoproduction of <i>Spirulina platensis</i>	39

3.3 Effects of inoculum size on cell growth and C-phycoyanin photoproduction of <i>Spirulina platensis</i>.....	40
3.3.1 Effects of inoculum size on cell growth of <i>Spirulina platensis</i>	41
3.3.2 Effects of inoculum size on consumption of nitrogen source.....	42
3.3.3 Effects of inoculum size on C-phycoyanin photoproduction of <i>Spirulina platensis</i>	43
3.4 Effects of stepwise increasing light intensity on cell growth and C-phycoyanin photoproduction of <i>Spirulina platensis</i>.....	44
3.4.1 Effects of stepwise increasing light intensity on cell growth of <i>Spirulina platensis</i>	45
3.4.2 Effects of stepwise increasing light intensity on consumption of nitrogen source.....	45
3.4.3 Effects of stepwise increasing light intensity on C-phycoyanin photoproduction of <i>Spirulina platensis</i>	46
3.5 Effects of Fed-batch on cell growth and C-phycoyanin photoproduction of <i>Spirulina platensis</i>	47
3.5.1 Effects of Fed-batch on cell growth of <i>Spirulina platensis</i>	51
3.5.2 Effects of Fed-batch on consumption of nitrogen source	52
3.5.3 Effects of Fed-batch on C-phycoyanin photoproduction of <i>Spirulina platensis</i>	52
3.6 Comparison of two cultivate strategies	53
3.7 Conclusions.....	53
Chap 4 Optimization of the extraction conditions of the C-phycoyanin from <i>Spirulina platensis</i> using response surface analysis	54
4.1 Single factor experiment.....	54
4.1.1 Effects of different extraction time on extraction yield of C-phycoyanin content	54
4.1.2 Effects of different extraction temperature on extraction yield of	

C-phycoerythrin content	55
4.1.3 Effects of different solid-to-liquid ratio on extraction yield of C-phycoerythrin content	55
4.2 Response surface methodology	56
4.2.1 Design of response surface experiments	56
4.2.2 Design and results of experiments	57
4.2.3 Analysis of response surface results	58
4.2.4 Interaction between different factors	59
4.2.5 Results of optimization	63
4.3 Conclusions	64
Chap 5 Conclusions and prospects	65
5.1 Conclusions	65
5.2 Prospects	66
References	67
Publications during graduate study	77
Acknowledgements	78

第一章 文献综述

1.1 藻蓝蛋白概述

藻蓝蛋白 (Phycocyanin) 是一类普遍存在于蓝藻 (*Cyanophyceae*) 细胞中的光合辅助色素, 是一种由开链四吡咯化合物和脱辅蛋白 (Apoprotein) 通过硫醚键结合^[1]的特殊色素蛋白, 其理论研究和应用近年来得到广泛的重视。藻蓝蛋白在螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 中的含量高达 10-20%, 是螺旋藻细胞中重要的光合作用天然色素, 在光合作用中能以近乎 100% 的高效率把光能优先地传递给光系统^[2,3]。

1.1.1 藻胆蛋白概述

藻胆蛋白 (Phycobiliproteins, PBPs) 主要存在于原核的蓝藻 (*Cyanophyceae*)、真核的红藻 (*Rhodophyceae*)、隐藻 (*Cryptophyceae*) 和少数一些甲藻 (*Pyrrophyceae*) 中^[4], 作为这些藻类特有的捕光色素蛋白, 藻胆蛋白是 1836 年 Esenbeck 首次从颤藻 (*Oscillatoria* sp.) 中发现, 并于 1843 年由 Kützing 命名^[5]。它的主要功能是作为光合作用的捕光色素复合体, 在一些藻类中也可以作为储藏蛋白, 在氮源缺乏时分解, 提供氮源。

藻胆蛋白的光吸收区位于蓝绿光区, 可以利用高等植物不能利用的光能, 根据吸收光谱的不同, 可将藻胆蛋白分为 3 大类: 藻红蛋白 (Phycoerythrin, 简称 PE, $\lambda_{\max}=540-570$ nm), 藻蓝蛋白 (Phycocyanin, 简称 PC, $\lambda_{\max}=615-640$ nm) 和别藻蓝蛋白 (Allophycocyanin, 简称 APC, $\lambda_{\max}=650-655$ nm)^[4]。根据来源的不同, 每大类又可以分为若干个小类, 每一小类前面分别冠以 B、C 和 R^[3,5,6]。

每分子藻胆蛋白含有两条结构相似的多肽链 α 和 β , α 亚基和 β 亚基分别含有约 160-180 个氨基酸残基, α 亚基的分子量为 10-19 kD, β 亚基的分子量为 14-21 kD, 二者的比例通常为 1:1, 每个亚基连接 1-4 个辅基色素, 使藻胆蛋白具有特定的吸收光谱^[7]。在 B-和 R-藻红蛋白中还有少量 γ 亚基存在。每条多肽链是由脱辅基蛋白和开环四吡咯结构的色基组成。藻胆蛋白中的色基称为藻胆素

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库