



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110944522 A

(43)申请公布日 2020.03.31

(21)申请号 201880036496.4

M·贡卡维斯·阿尔维斯

(22)申请日 2018.06.15

(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

(30)优先权数据

1770630 2017.06.15 FR

代理人 张培源 庞东成

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.12.02

(51)Int.Cl.

A23L 5/46(2006.01)

A61K 35/748(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/FR2018/000172 2018.06.15

A23L 33/195(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/229364 FR 2018.12.20

(71)申请人 奥伽马公司

地址 法国埃夫里

申请人 沃克吕兹地区与阿维尼翁大学

(72)发明人 F·切马特 M·艾伯特·维安

L·韦尔纳 T·菲利斯

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

按照条约第19条修改的权利要求书1页

(54)发明名称

从微藻和/或蓝细菌中提取水溶性化合物的方法

(57)摘要

本发明涉及生物质、特别是藻类生物质的提质领域,更具体地,本发明涉及从微藻和/或蓝细菌中提取水溶性化合物的方法,以及通过该方法获得的产品及其应用,特别是在食品工业中或作为食品补充剂的应用。

1. 一种从真核或原核(蓝细菌)微藻中获得水溶性化合物的方法,其特征在于,所述方法包括至少一个通过超声波处理提取所述水溶性化合物的步骤,所述超声波处理对与水溶液混合的微藻或蓝细菌施加的超声波功率(Pus)为1W/L至1000W/L,优选同时对其施加1巴至2巴的压力(P)、X至70℃的温度(T)、X至1L/分钟的流速(D)。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,对超声波功率、压力、温度和流速进行调节来使得从所述真核微藻或蓝细菌中提取的水溶性化合物有所不同。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述步骤的持续时间为30秒至1小时。

4. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,对超声波功率、压力、温度和流速进行调节来使得通过所述方法获得的提取物的颜色有所不同。

5. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,对所述真核微藻类或蓝细菌和水溶液的混合物连续施行所述步骤,优选地采用泵进行,以确保所述混合物在闭合或开放的回路中循环。

6. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,所提取的水溶性化合物选自蛋白质和肽、水溶性维生素、优选B族维生素、矿物质、优选钠、钙、钾、镁和铁、C-藻蓝蛋白和叶绿素。

7. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,所述真核微藻选自小球藻属、微拟球藻属、杜氏藻属和裸藻属,并且所述蓝细菌选自螺旋藻属(钝顶节旋藻(*Arthrospira platensis*)或极大螺旋藻(*Spirulina maxima*))和AFA(水华束丝藻(*Aphanizomenon Floes-aquae*))。

8. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,所述方法包括对所获得的提取物进行固液分离的额外步骤,优选通过离心进行。

9. 如权利要求8所述的方法,其特征在于,所述方法包括对通过从所述提取物中分离而获得的液体部分进行过滤的额外步骤。

10. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,所述微藻或蓝细菌/水溶液的比率为1/5至1/50。

11. 通过前述权利要求中任一项的方法获得的产品,其包含存在于所述微藻或蓝细菌中的水溶性化合物。

12. 权利要求11的产品在化学、食品、化妆品或药物组合物中的应用。

从微藻和/或蓝细菌中提取水溶性化合物的方法

[0001] 本发明涉及生物质、特别是藻类生物质的提质领域,更具体地,本发明涉及从微藻和/或蓝细菌中提取水溶性化合物的方法,以及通过该方法获得的产品及其应用,特别是在食品工业中或作为食品补充剂的应用。

[0002] 为了应对全球粮食需求的增长,许多制造商都将目光投向了如微藻等替代资源。具有很大生物多样性的这些微生物代表了独特的生物质来源。其产量与在可耕地上种植的园艺植物和谷物作物的区别在于其非常高的表面产量。

[0003] 增长超过30年的微藻构成了全食品产品。在人类和动物营养中,存在两种提质手段:第一种由以全微藻消费为目标构成,第二种涉及从中提取、转化和调节生物活性分子。在法国,只有三种微藻物种被获准供人类食用而无需转化并具有出色的营养特性:螺旋藻或钝顶节螺旋藻(*Arthrospira platensis*)、绿色微藻小球藻(*Chlorella*)和硅藻金色奥杜藻(*Odontella aurita*)。由于这些微生物在蛋白质方面的独特含量及其生产的低环境影响(低的水和能源消耗),其据称是全球食品供应挑战中的主要元素。

[0004] 因此特别是近几年来,螺旋藻引起了众多研究者和制造商的关注。其作为干燥的未转化形式已在市场上非常普遍,作为食品补充剂消耗。

[0005] 螺旋藻含有大量具有高附加值的化合物,许多研究人员和制造商对从这种蓝细菌中提取目标化合物感兴趣。通常从螺旋藻中提取的生物分子是藻蓝蛋白(PC),其为抗氧化性的蓝色色素蛋白,占螺旋藻干重的20%(Vonshak,1997)。对于藻蓝蛋白的这种日益增长的兴趣特别可通过其着色强度来得以解释。目前,法国使用的蓝色食用色素是合成的:专利蓝V和亮蓝;它们常出现在糖果和饮料等的成分中。专利蓝V可能是放大儿童多动症的起因并且可能构成潜在的过敏原,这就是为何近来其在美国、加拿大和澳大利亚被禁用的原因。由此,对天然着色剂特别是藻蓝蛋白的使用已受到特别关注。许多研究因而都基于从螺旋藻中提取这种蛋白质。在实验室规模上使用了诸如在不同溶剂中浸渍、酶解、超声等方法。因此,文献研究详述了从螺旋藻中提取PC的几种方案:在0.1M和pH 6.8的磷酸盐缓冲液中利用超声(20kHz,200W)(Furuki等,2003),在室温连续搅拌下的磷酸盐缓冲液中浸渍4小时(Chaiklahan等,2011),使用含溶菌酶的Tris-HCl缓冲液(Wenjun等,2013),在蒸馏水中冷浸24小时(Kamble等,2013),在30%的乙酸钠缓冲液中浸渍24小时(Silveira等,2007)。

[0006] 为了大量生产PC提取物,已经开发了从螺旋藻中提取的方法或将其改造至工业规模。因此,发现了保护提取方法的专利。例如,Ecosystem于2013年提交的专利W0 2014045177A1保护了一种提取方法,该方法包括将螺旋藻生物质在甘油中浸渍15天,然后使用终端过滤以回收包含浓缩PC的滤液。然而,这种通过浸渍进行提取的方法有两点不足:提取时间长且产率低。为了克服该问题,近几年出现了称为“强化法”的其他方法:使用微波、超声、超临界流体(CO₂)、酶解法等。超临界流体主要用于提取疏水性脂溶性化合物,例如类胡萝卜素、生育酚、脂肪酸等(Supercritical Carbon Dioxide and Microwave-Assisted Extraction of Functional Lipophilic Compounds from *Arthrospira platensis*,Esquivel-Hernández等,2016)。此外,几位作者报告了超声在提取微藻尤其是螺旋藻中的应用(Ultrasound assisted extraction of beta-carotene from *Spirulina*

platensis, Dey和Rathod, 2013_Phyco-cyanin extraction from microalgae *Spirulina platensis* assisted by ultrasound irradiation: effect of time and temperature, Hadiyanto等, 2016)。与诸如浸渍等传统方法相比, 这些称为“强化技术”的技术具有更快且更有效的优势。然而, 常规的超声提取技术无法获得可根据对于每种水溶性化合物所需的性质和品质对所提取的水溶性化合物的组成进行调节的提取物。

[0007] 上文引用的方法旨在获得藻蓝蛋白中“结合”的螺旋藻提取物, 以用作天然食用色素或以单位小瓶的形式用作食品补充剂。迄今为止, 仅打算将极少数几种螺旋藻提取物掺入食品配方中且仅用于对其着色。

[0008] 在由纤维素构成且具有很强的刚性而导致其对机械应力的抗性增加的某些其他微藻(如小球藻)中, 这些方法将无法有效地提取如叶绿素等水溶性化合物。

[0009] 申请人现已开发出一种方法, 该方法使得可以在提取开始起效的最初, 通过在处理微藻期间对超声波施加的其他参数例如压力、温度、流速等来调节由超声波产生的空化气泡, 由此使得可以根据提取物中所需水溶性化合物的性质和数量而对水溶性化合物提取方法进行增强和调节。

[0010] 与市场上已经存在的相反, 根据本发明的方法使得可以在工业规模上以优化的方式从起始微藻生物质的水溶液和方法产生旨在用于人类食物的具有高营养价值的不同提取物, 其富含水溶性化合物、特别是蛋白质、水溶性维生素、叶绿素、藻蓝蛋白和矿物质, 所述提取物具有可调节的所述水溶性化合物的组成。因此, 根据开始时选择的超声波功率(P_{us})、温度、压力和流速等参数, 可以使来自提取物的营养成分有所不同, 且其颜色也有所不同。

[0011] 因此, 本发明的第一目的涉及一种从真核微藻(microalgae)或原核生物(蓝细菌(cyanobacteria))中获得水溶性化合物的方法, 其特征在于所述方法包括至少一个通过超声波处理提取所述水溶性化合物的步骤, 所述超声波处理对与水溶液混合的微藻或蓝细菌施加的超声波功率(P_{us})为1W/L至1000W/L, 优选同时对其施加1巴(bar)至2巴的压力(P)、5℃至70℃的温度(T)、1L/h至1000L/h的流速(D)。

[0012] 根据本发明, 微藻是指以细胞壁和细胞核为特征且包括绿藻(chlorophytes)、金藻(chrysophytes)和甲藻(pyrrhophytes)的真核微藻(所述真核微藻通常被称为“微藻”), 以及没有细胞核和细胞壁且包括蓝藻(cyanophytes)的原核微藻, 蓝藻在下文特称为“蓝细菌(cyanobacteria)”。

[0013] 优选地, 根据本发明, 真核微藻选自绿藻, 优选地选自小球藻属(*Chlorella*)、微拟球藻属(*Nannochloropsis*)、杜氏藻属(*Dunaliella*)和裸藻属(*Euglena*)。

[0014] 优选地, 根据本发明, 蓝细菌选自螺旋藻属(钝顶节旋藻(*Arthrospira platensis*)或极大螺旋藻(*Spirulina maxima*))和AFA(水华束丝藻(*Aphanizomenon flos-aquae*))。

[0015] 特别优选地, 根据本发明, 本发明的微藻是螺旋藻。

[0016] 根据本发明, 水溶性化合物是指可溶于水并且包含在微藻和/或蓝细菌中的化合物, 其优选选自蛋白质和肽、水溶性维生素、优选B族维生素(特别是硫胺素(B1)、核黄素(B2)、烟酸(B3)、泛酸(B5)、吡哆醇(B6)、生物素(B8)、叶酸(B9)、钴胺素(B12))、矿物质、优选钠、钙、钾、镁和铁、C-藻蓝蛋白(或藻蓝蛋白)和叶绿素。

[0017] 特别优选地,根据本发明,本发明的微藻是螺旋藻,而水溶性化合物是C-藻蓝蛋白。

[0018] 根据本发明,使用超声功率(P_{us})的超声处理是指采用超声反应器的物理处理。优选地,根据本发明,超声功率为10W/L至1000W/L水溶液(其混合有微藻或蓝细菌),优选为30W/L至100W/L,还优选为50W/L至80W/L。优选地,由超声反应器分配的能量在500至5000J之间变化,超声反应器的供应流速在1L/小时至1000L/小时之间变化,优选1L/小时,并且进行超声处理的持续时间在30秒至90分钟变化。

[0019] 根据本发明,水溶液是指适合于食品应用的水溶液。优选地,这意味着缓冲的水,优选pH 7的磷酸盐缓冲液,所用的缓冲剂是磷酸钠。特别地,根据本发明的水溶液优选不含任何化学防腐剂,也不含有机溶剂或石油化学来源(甲醇、氯仿、己烷、乙醇),它们具有使其不能与通过本发明的方法获得的水溶性化合物的食品应用相容的毒性。也不希望使用酸溶剂,因为某些水溶性化合物如藻蓝蛋白对pH非常敏感,并且pH的任何显着变化、低于pH 5和高于pH 7.5都会导致其沉淀。醇溶剂不是优选的,因为某些水溶性化合物如藻蓝蛋白因此损失其大部分抗氧化性。

[0020] 优选地,根据本发明,微藻或蓝细菌/水溶液的比率为1/5至1/50。

[0021] 对该超声处理和该流同时施加1巴至2巴的压力(P)和5℃至70℃、优选20℃至30℃的温度(T)。特别优选地,在提取水溶性化合物的方法的整个过程中,温度保持恒定在20℃至30℃之间。

[0022] 优选地,根据本发明,微藻/水溶液混合物被收集在双壁容器中。借助于水循环和使得可以调节所需温度的恒温器,可以对所述容器进行恒温控制。然后使用泵和阀将混合物送至超声反应器,该超声反应器包括连接至超声发生器的超声探头。所述超声反应器本身也可以优选地配备有两个壁,使得借助于水循环和使得可以调节所需温度的恒温器可以对其进行恒温控制。阀使得可以对混合物的循环施加阻力,因此可以增加混合物所承受的压力。优选地,压力计使得可以在超声反应器的上游监测施加在混合物上的压力,并调节阀的开放以在混合物上施加所需的压力。

[0023] 因此,优选地,根据本发明,使用恒温器、优选通过在包含微藻类/水溶液混合物的反应器的两个壁中经恒温控制的水循环来控制温度(T),并且将混合物保持在所需温度。必须注意,在超声处理步骤中,在有可能施加大于1巴的压力时,混合物的温度将趋于升高,因此恒温器可以起到维持混合物温度恒定的作用。控制温度使得可以避免温度升得过高,否则可能会有损害热敏感性(称为不耐热)的水溶性化合物的风险。申请人强调,当温度超过40℃时,某些感兴趣的分子例如藻蓝蛋白可能被掩盖(例如,被叶绿素掩盖)。此外,提取感兴趣的水溶性化合物的最佳温度处于约25℃。因此,通过在20℃的热调节并结合超声波的加热效应,可以获得接近25℃至30℃(接近最佳提取温度)的温度。然而,调节温度使得可以提取不同类型的化合物:在低温下,有利于不耐热化合物的提取,而在升高的温度下,热敏感性化合物被掩盖,而诸如叶绿素等难以冷提取的其他分子(具有非极性性质,通常可溶于有机溶剂)会出现在溶液中。

[0024] 优选地,根据本发明,使用阀对系统施加压力(P),使得可以对要施加P_{us}的反应器供应,并且可以对系统中的微藻类/水溶液混合物的循环施加阻力。阀越靠近关闭位置,由于孔口变窄,流动变得越困难,这会导致系统中微藻类/水溶液混合物的循环变慢;然而,泵

施加恒定流速,这会导致压力增加。

[0025] 根据本发明的优选方面,调节超声波功率、压力、温度和流速以使从所述真核微藻或蓝细菌提取的水溶性化合物有所变化。

[0026] 因此,通过调节P_{us}、T、P和/或D,可以使用给定的水溶液从一种相同的起始微藻或蓝细菌生物质中产生不同的提取物。

[0027] 因此,优选地,根据本发明,超声功率、传递至环境的压力和温度越高,提取物就会更富含蛋白质和叶绿素。相反,超声波功率和温度越低,提取物中水溶性化合物的富集越低。

[0028] 因此,例如,可以对螺旋藻和磷酸盐缓冲液混合物7施加100W/L的超声波功率以及在20℃的受控温度下的2巴的压力,持续10分钟,以获得更富含叶绿素的提取物,因此与施加30W/L的超声波功率以及在20℃的受控温度下的1巴的压力持续10分钟的方法相比具有更强的绿色,而后者更蓝。

[0029] 优选地,根据本发明,超声处理步骤的持续时间在1至90分钟之间。调节持续时间使得可以改变水溶性化合物的组成,并因此也改变浓度。这可以通过以下事实来解释:微藻类/水溶液混合物在超声反应器中通过地越频繁,就会越多地受到超声作用并释放出越多水溶性化合物。

[0030] 根据本发明的优选方面,通过所述方法调节超声功率、压力、温度和流速来使所获得的提取物的颜色有所不同。

[0031] 因此,优选地,根据本发明,超声功率、传递到环境的压力和温度越高,提取物中的蛋白质和叶绿素就越丰富,因此绿色越浓。相反,超声波功率和温度越低,提取物中水溶性化合物的富集越低,并且生成的提取物的颜色越蓝(由于没有叶绿素)。

[0032] 根据本发明的一个优选方面,将所述步骤连续地应用于真核微藻或蓝细菌和水溶液的混合物,优选使用确保混合物在封闭或开放回路中循环的泵进行。

[0033] 根据本发明的一个优选方面,根据本发明的用于获得水溶性化合物的方法还包括对提取步骤期间获得的提取物进行固-液分离的额外步骤,优选通过离心进行。

[0034] 根据本发明的一个优选方面,根据本发明的用于获得水溶性化合物的方法还包括对通过从提取物中分离出固体部分(细胞碎片)而获得的液体部分进行过滤的额外步骤。

[0035] 优选地,根据本发明,过滤以终端方式进行,有利地在食品过滤器上进行,例如由聚酰胺制成(特别是由尼龙制成)的食品过滤器,其细度为2微米至50微米,优选小于25微米。

[0036] 根据第二种提取物,本发明涉及例如通过根据本发明的方法获得的产物,其包含存在于微藻或蓝细菌中的水溶性化合物。

[0037] 更具体地,所述方法使得可以从微藻或蓝细菌中提取出水溶性化合物,其与微藻和蓝细菌的脂溶性级分分离开。优选地,所产生的提取物将具有感官品质以及最佳的营养组成。

[0038] 根据第三方面,本发明涉及诸如通过本发明的方法获得的产品在化学、食品、化妆品或药物组合物中的应用。

[0039] 由于这些滤液/提取物呈现出的上述优点,其在食品、医疗或化妆品工业中的应用、包括作为食品补充剂的应用经证明是特别有用的。本发明还旨在将从过滤步骤获得的

滤余物作为新产品。这些滤余物也可用于食品、医疗或化妆品工业,或用作食品补充剂。

[0040] 现在将参考所附示意图来描述作为非限制性示例的本发明的实施方式,其中图1是用于实施根据本发明的方法的压热超声(MTS)安装装置的示意图,其包括探头和产生Pus的超声反应器、调节T的恒温器、调节P的阀和压力计以及调节D的泵。现在将描述作为非限制性示例的根据本发明的方法的顺序。

[0041] 所述方法以闭路或开路的形式(根据选择的循环数)呈现,使得可以连续处理微藻溶液(MS中为5%)。

[0042] 对MTS安装的不同要素的说明:

[0043] 1) 容器可以接收待处理的微藻和水溶液混合物。其为双壁容器,可借助水循环进行恒温控制。

[0044] 2) 泵调节系统中混合物的循环为恒定流速。

[0045] 3) 超声探头连接到发生器,从而可以固定所需的超声功率。探头浸入待处理的液体中的2/3处,并发射出自身特定的固定频率(约20kHz)。

[0046] 4) 超声反应器配备有两个壁,从而可以通过受恒温控制的水的循环来恒温控制所述混合物。超声波探头进入反应器,以便在环境中传递超声波。

[0047] 5) 阀可以对混合物的循环施加阻力,并因此增加系统中的压力。可以在处于超声反应器上游的压力计上可视化地监视这种压力变化。

[0048] 一旦混合物在连续装置中经超声处理,则将系统排空,以便将混合物送至离心模块,从而可以进行在固体生物质残渣和水溶性级分之间的固/液分离。过滤步骤使得可以获得澄清透明的提取物。

实施例

[0049] 实施例1:US低功率、无压力→蓝色提取物

[0050] 按照比例1/20将生物质(钝顶节旋藻)与提取水溶液(磷酸盐缓冲液pH 7)混合;即20g水溶液中有1g生物质。在本例中,将4g螺旋藻引入80mL水溶液中。使混合物经受低超声功率超声(30W)10分钟,并热调节在20℃。不对系统施加压力。然后将提取物以8000rpm离心10分钟,然后在布氏漏斗(Büchner)(孔隙度8μm)上通过终端过滤进行过滤,以除去可能的悬浮颗粒。

[0051] 获得的提取物因藻蓝蛋白(8.34g/100g干物质(MS))的存在而呈蓝色,并且包含33.36g/100g MS的蛋白质。

[0052] 实施例2:US大功率+压力→绿色、富含蛋白质的提取物

[0053] 按照比例1/20将生物质(钝顶节旋藻)与提取水溶液(磷酸盐缓冲液pH 7)混合;即20g水溶液中有1g生物质。在本例中,将4g螺旋藻引入80mL水溶液中。使混合物经受超声功率超声(100W/L,约为振幅的80%)10分钟,热调节在20℃且压力接近2巴。然后将提取物以8000rpm离心10分钟,然后在布氏漏斗(孔隙度8μm)上通过终端过滤进行过滤,以除去可能的悬浮颗粒。

[0054] 获得的提取物因叶绿素(其由于本方法的强度而被提取出)的存在而呈深绿色。藻蓝蛋白仍存在于提取物中(11.47g/100g MS),且蛋白质含量为46.19%。

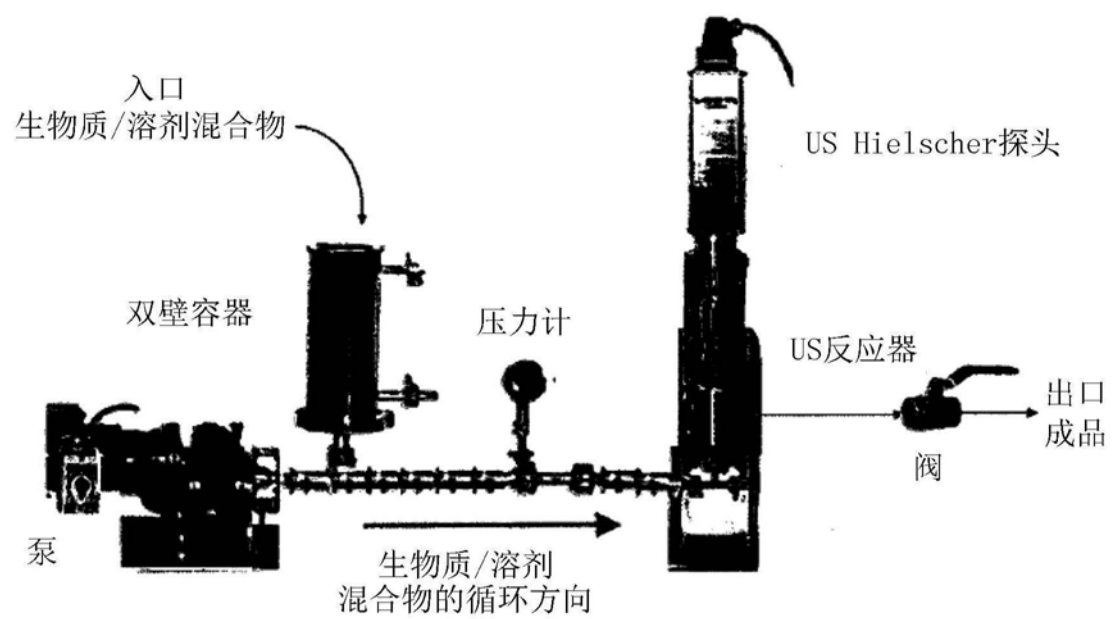


图1

1. 一种从真核或原核(蓝细菌)微藻中获得水溶性化合物的方法,其特征在于,所述方法包括至少一个通过超声波处理提取所述水溶性化合物的步骤,所述超声波处理对与水溶液混合的微藻或蓝细菌施加的超声波功率(P_{us})为10W/L至1000W/L,同时对其施加1巴至2巴的压力(P)、5℃至70℃的温度(T)、1L/小时至1000L/小时的流速(D)。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,对超声波功率、压力、温度和流速进行调节来使得从所述真核微藻或蓝细菌中提取的水溶性化合物有所不同。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述步骤的持续时间为30秒至90分钟。

4. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,对超声波功率、压力、温度和流速进行调节来使得通过所述方法获得的提取物的颜色有所不同。

5. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,对所述真核微藻类或蓝细菌和水溶液的混合物连续施行所述步骤,优选地采用泵进行,以确保所述混合物在闭合或开放的回路中循环。

6. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,所提取的水溶性化合物选自蛋白质和肽、水溶性维生素、优选B族维生素、矿物质、优选钠、钙、钾、镁和铁、C-藻蓝蛋白和叶绿素。

7. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,所述真核微藻选自小球藻属、微拟球藻属、杜氏藻属和裸藻属,并且所述蓝细菌选自螺旋藻属(钝顶节旋藻(*Arthrospira platensis*)或极大螺旋藻(*Spirulina maxima*))和AFA(水华束丝藻(*Aphanizomenon flos-aquae*))。

8. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,所述方法包括对所获得的提取物进行固液分离的额外步骤,优选通过离心进行。

9. 如权利要求8所述的方法,其特征在于,所述方法包括对通过从所述提取物中分离而获得的液体部分进行过滤的额外步骤。

10. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其特征在于,所述微藻或蓝细菌/水溶液的比率为1/5至1/50。

11. 通过前述权利要求中任一项的方法获得的产品,其包含与所述微藻或蓝细菌的脂溶性级分分离的存在于所述微藻或蓝细菌中的水溶性化合物。

12. 权利要求11的产品在化学、食品、化妆品或药物组合物中的应用。