



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 119192425 B

(45) 授权公告日 2025. 04. 08

(21) 申请号 202411657904.1

(22) 申请日 2024.11.20

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 119192425 A

(43) 申请公布日 2024.12.27

(73) 专利权人 山东省寿光蔬菜产业集团有限公司

地址 262700 山东省潍坊市寿光市洛城街
道豪源路9号蔬菜大厦A座8-11层

专利权人 山东农业大学
寿光蔬菜产业集团食品有限公司

(72) 发明人 辛晓菲 亓烨 李栋 曹怀美
李大鹏 程晓丽 张伟杰 孟德来
国艳春

(74) 专利代理机构 山东华君知识产权代理有限公司 37300

专利代理师 武欢欢

(51) Int.Cl.
C08B 37/00 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 113584013 A, 2021.11.02
孙向军.螺旋藻多糖提取新工艺的研究.食品科技.2000, (第02期), 第32-34页.

审查员 谢昕

权利要求书2页 说明书8页

(54) 发明名称

一种螺旋藻多糖的提取方法

(57) 摘要

本发明提供了一种螺旋藻多糖的提取方法,属于植物多糖提取技术领域;所述提取方法包括破壁处理、酶解、分离以及纯化;所述酶解步骤为,向螺旋藻多糖提取液中加入盐酸溶液,调节pH,然后加入功能酶进行酶解,制得酶解液;所述功能酶的制备方法,包括生物炭预处理、交联、负载;所述交联步骤为,将预处理甲壳素和预处理生物炭置于去离子水中,搅拌均匀后加入戊二醛溶液,室温下搅拌3.8-4.2h,搅拌结束后,经静置离心洗涤后,进行冷冻干燥,制得交联载体;采用本发明的方法,螺旋藻多糖得率高,总糖含量高,功能酶的重复使用性能佳。

1. 一种螺旋藻多糖的提取方法,其特征在于,包括破壁处理、酶解、分离以及纯化步骤;

所述破壁步骤为,将螺旋藻干粉置于去离子水中,加入单甘油脂肪酸酯,搅拌0.8-1.2h,然后进行均质处理,均质时间为4-6min,均质压力为6.2-6.7MPa,均质次数为3次,均质处理结束后,加入10-14wt%氢氧化钠溶液,控制pH值为9.8-10.2,在78-82℃下水浴5.8-6.2h,制得螺旋藻多糖提取液;

所述螺旋藻干粉、去离子水和单甘油脂肪酸酯的质量比为8-12:290-310:0.10-0.14;

所述酶解步骤为,向螺旋藻多糖提取液中加入8-12wt%盐酸溶液,调节pH为6.1-6.4,然后加入功能酶进行超声处理,超声时间为23-27min,超声功率为83-88W,超声频率为20-25kHz,超声处理结束后,以1.7-2.2℃/min速率升温至50-54℃进行酶解,酶解时间为9-12h,酶解结束后,在72-76℃下水浴处理3.1-3.5h,制得酶解液;

所述螺旋藻多糖提取液和功能酶的质量比为4.0-4.2kg:3.5-3.7g;

所述功能酶的制备方法,包括生物炭预处理、交联、负载步骤;

所述生物炭预处理步骤为,将生物炭置于密闭容器中,喷淋预分散液,喷淋的同时控制温度为43-47℃,搅拌转速为210-230rpm,控制喷淋速率为3.7-4.2g/min,喷淋结束后,在78-82℃下干燥5.8-6.2h,制得预分散生物炭;将预分散生物炭置于预处理液中,室温下进行搅拌反应,反应时间为9.8-10.3h,搅拌转速为195-206rpm,搅拌结束后,经过滤洗涤干燥后,制得预处理生物炭;

所述预分散液为30-34wt%乙醇溶液、鼠李糖脂和蔗糖脂肪酸酯的混合液,所述30-34wt%乙醇溶液、鼠李糖脂和蔗糖脂肪酸酯的质量比为78-83:1.1-1.5:1.5-1.8;

所述预处理液是由去离子水、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐和盐酸多巴胺混合均匀制得,所述去离子水、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐和盐酸多巴胺的质量比为495-505:0.63-0.67:2.1-2.3;

所述交联步骤为,将预处理甲壳素和预处理生物炭置于去离子水中,搅拌均匀后加入戊二醛溶液,室温下搅拌3.8-4.2h,搅拌结束后,经静置离心洗涤后,进行冷冻干燥,干燥温度为-34~-30℃,干燥时间为10-13h,干燥结束后,自然恢复至室温,制得交联载体;

所述预处理甲壳素、预处理生物炭、去离子水和戊二醛溶液的质量体积比为3.4-3.8g:2.7-3.3g:115-124g:58-63mL;

所述戊二醛溶液的质量浓度为3.4-3.7%;

所述预处理甲壳素的制备方法为,将甲壳素置于酸液中,升高温度至50-54℃,进行超声处理,超声时间为18-22min,超声功率为226-235W,超声频率为15-20kHz,超声结束后,以1.8-2.2℃/min速率升温至80-84℃,在氮气气氛下进行球磨处理,球磨时间为1.4-1.6h,球磨转速为116-124rpm,球料比为3-5:1,球磨结束后,经过滤洗涤干燥,制得预处理甲壳素;

所述甲壳素的长度为190-210nm,宽度为35-45nm;

所述甲壳素、酸液的质量比为10.0-10.5:96-105;

所述酸液为盐酸、水杨酸和去离子水的混合物,所述盐酸、水杨酸和去离子水的质量比为5.0-5.2:1.8-2.2:50-55;

所述负载步骤为,将交联载体置于去离子水中,升高温度至58-62℃,加入木瓜蛋白酶,进行搅拌,搅拌转速是163-175rpm,搅拌时间为2.0-2.5h,搅拌结束后,离心后在58-63℃下干燥7.8-8.4h,制得功能酶;

所述交联载体、去离子水、木瓜蛋白酶的质量比为1.1-1.5:17.1-17.8:0.6-0.8。

2. 根据权利要求1所述的一种螺旋藻多糖的提取方法,其特征在于,

所述生物炭预处理步骤中,所述生物炭的粒径为145-155nm;

所述生物炭、预分散液的质量比为10.3-10.5:82-86。

3. 根据权利要求1所述的一种螺旋藻多糖的提取方法,其特征在于,

所述生物炭预处理步骤中,所述预分散生物炭与预处理液的质量体积比为9.6-10.3g:490-508mL。

4. 根据权利要求1所述的一种螺旋藻多糖的提取方法,其特征在于,

所述分离步骤为,将酶解液进行离心处理,离心转速为2680-2730rpm,离心时间为12-17min,离心结束后将上清液进行浓缩,浓缩至上清液原体积的1/4,浓缩温度为72-75℃,真空度为0.080-0.084MPa,浓缩结束后,冷却至室温,得到浓缩液。

5. 根据权利要求1所述的一种螺旋藻多糖的提取方法,其特征在于,

所述纯化步骤为,将浓缩液与6-8倍体积的93-97wt%乙醇溶液混合,静置11-13h,离心后,得到一次上清液和一次沉淀,一次沉淀用2.5-3.5倍质量的无水乙醇洗涤、滤干,得到湿态固体一;将一次上清液与4.8-5.2倍体积的93-97wt%乙醇溶液混合,静置10-13h后进行离心,得到二次上清液和二次沉淀,将二次沉淀用2.5-3.5倍质量的无水乙醇洗涤并滤干,得到湿态固体二;将湿态固体一和湿态固体二混合后进行真空干燥,干燥温度为58-62℃,真空度为0.088-0.093MPa,干燥时间为8.0-8.4h,干燥结束后,制得螺旋藻多糖。

一种螺旋藻多糖的提取方法

技术领域

[0001] 本发明属于植物多糖提取技术领域,具体涉及一种螺旋藻多糖的提取方法。

背景技术

[0002] 螺旋藻多糖是从螺旋藻中提取出的生理活性多糖,是一种水溶性多糖,是联合国粮农组织推荐的“21世纪最理想的食物”,其被广泛应用于化妆、保健、医药等领域;螺旋藻多糖具有抗肿瘤、抗辐射、促进DNA合成及免疫增强作用;近年来,螺旋藻多糖还可以作为肝炎、糖尿病、胃溃疡的辅助治疗,有利于机体的延缓衰老作用,其还具有免疫增强、改善造血功能及促进蛋白质合成的作用。

[0003] 目前,已有的螺旋藻多糖的提取方法,包括碱浸提取法、超声波碎裂提取法、微波辅助提取法、反复冻融破壁法、酶辅助提取法或其中两种方法组合提取;但是其均存在螺旋藻多糖得率低的缺陷;

[0004] 对此,现有技术公开了以下内容:

[0005] CN108727510A公开了一种螺旋藻多糖提取物及其制备方法和增强免疫功能的应用,具体公开了是将螺旋藻干粉与焦磷酸钠溶液混合进行破壁处理,然后加入蛋白酶进行酶解,再采用醇沉的方法对多糖进行沉淀,最后经洗涤干燥,制得螺旋藻多糖;

[0006] 采用该方法得到的螺旋藻多糖,得率达到10.64%,总含量为25.35%;但是采用该方法提取的螺旋藻多糖总糖含量低。

发明内容

[0007] 为了解决现有技术存在的技术问题,本发明提供了一种螺旋藻多糖的提取方法,螺旋藻多糖的得率高,总糖含量高。

[0008] 针对上述技术问题,本发明采取以下技术方案:

[0009] 一种螺旋藻多糖的提取方法,包括破壁处理、酶解、分离以及纯化步骤,具体操作如下:

[0010] 1.破壁处理

[0011] 将螺旋藻干粉置于去离子水中,加入单甘油脂肪酸酯,搅拌0.8-1.2h,然后进行均质处理,均质时间为4-6min,均质压力为6.2-6.7MPa,均质次数为3次,均质处理结束后,加入10-14wt%氢氧化钠溶液,控制pH值为9.8-10.2,在78-82℃下水浴5.8-6.2h,制得螺旋藻多糖提取液;

[0012] 所述螺旋藻干粉、去离子水和单甘油脂肪酸酯的质量比为8-12:290-310:0.10-0.14;

[0013] 2.酶解

[0014] 向螺旋藻多糖提取液中加入8-12wt%盐酸溶液,调节pH为6.1-6.4,然后加入功能酶进行超声处理,超声时间为23-27min,超声功率为83-88W,超声频率为20-25kHz,超声处理结束后,以1.7-2.2℃/min速率升温至50-54℃进行酶解,酶解时间为9-12h,酶解结束后,

制得酶解液；

[0015] 所述螺旋藻多糖提取液和功能酶的质量比为4.0-4.2kg:3.5-3.7g；

[0016] 所述功能酶的制备方法,包括以下步骤:

[0017] (1)生物炭预处理

[0018] 将生物炭置于密闭容器中,喷淋预分散液,喷淋的同时控制温度为43-47℃,搅拌转速为210-230rpm,控制喷淋速率为3.7-4.2g/min,喷淋结束后,在78-82℃下干燥5.8-6.2h,制得预分散生物炭;将预分散生物炭置于预处理液中,室温下进行搅拌反应,反应时间为9.8-10.3h,搅拌转速为195-206rpm,搅拌结束后,经过滤洗涤干燥后,制得预处理生物炭;

[0019] 所述生物炭的粒径为145-155nm;

[0020] 所述生物炭、预分散液的质量比为10.3-10.5:82-86;

[0021] 所述预分散液为30-34wt%乙醇溶液、鼠李糖脂和蔗糖脂肪酸酯的混合液,所述30-34wt%乙醇溶液、鼠李糖脂和蔗糖脂肪酸酯的质量比为78-83:1.1-1.5:1.5-1.8;

[0022] 所述预分散生物炭与预处理液的质量体积比为9.6-10.3g:490-508mL;

[0023] 所述预处理液是由去离子水、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐和盐酸多巴胺混合均匀制得,所述去离子水、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐和盐酸多巴胺的质量比为495-505:0.63-0.67:2.1-2.3;

[0024] (2)交联

[0025] 将甲壳素置于酸液中,升高温度至50-54℃,进行超声处理,超声时间为18-22min,超声功率为226-235W,超声频率为15-20kHz,超声结束后,以1.8-2.2℃/min速率升温至80-84℃,在氮气气氛下进行球磨处理,球磨时间为1.4-1.6h,球磨转速为116-124rpm,球料比为3-5:1,球磨结束后,经过滤洗涤干燥,制得预处理甲壳素;将预处理甲壳素和预处理生物炭置于去离子水中,搅拌均匀后加入戊二醛溶液,室温下搅拌3.8-4.2h,搅拌结束后,经静置离心洗涤后,进行冷冻干燥,干燥温度为-34~-30℃,干燥时间为10-13h,干燥结束后,自然恢复至室温,制得交联载体;

[0026] 所述甲壳素的长度为190-210nm,宽度为35-45nm;

[0027] 所述甲壳素、酸液的质量比为10.0-10.5:96-105;

[0028] 所述酸液为盐酸、水杨酸和去离子水的混合物,所述盐酸、水杨酸和去离子水的质量比为5.0-5.2:1.8-2.2:50-55;

[0029] 所述预处理甲壳素、预处理生物炭、去离子水和戊二醛溶液的质量体积比为3.4-3.8g:2.7-3.3g:115-124g:58-63mL;

[0030] 所述戊二醛溶液的质量浓度为3.4-3.7%;

[0031] (3)负载

[0032] 将交联载体置于去离子水中,升高温度至58-62℃,加入木瓜蛋白酶,进行搅拌,搅拌转速是163-175rpm,搅拌时间为2.0-2.5h,搅拌结束后,离心后在58-63℃下干燥7.8-8.4h,制得功能酶;

[0033] 所述交联载体、去离子水、木瓜蛋白酶的质量比为1.1-1.5:17.1-17.8:0.6-0.8;

[0034] 3.分离

[0035] 将酶解液进行离心处理,离心转速为2680-2730rpm,离心时间为12-17min,离心结

束后将上清液进行浓缩,浓缩至上清液原体积的1/4,浓缩温度为72-75℃,真空度为0.080-0.084MPa,浓缩结束后,冷却至室温,得到浓缩液。

[0036] 4.纯化

[0037] 将浓缩液与6-8倍体积的93-97wt%乙醇溶液混合,静置11-13h,离心后,得到一次上清液和一次沉淀,一次沉淀用2.5-3.5倍质量的无水乙醇洗涤、滤干,得到湿态固体一;将一次上清液与4.8-5.2倍体积的93-97wt%乙醇溶液混合,静置10-13h后进行离心,得到二次上清液和二次沉淀,将二次沉淀用2.5-3.5倍质量的无水乙醇洗涤并滤干,得到湿态固体二;将湿态固体一和湿态固体二混合后进行真空干燥,干燥温度为58-62℃,真空度为0.088-0.093MPa,干燥时间为8.0-8.4h,干燥结束后,制得螺旋藻多糖。

[0038] 与现有技术相比,本发明取得了以下有益效果:

[0039] 1.本发明采用酶解的方法对螺旋藻多糖进行提取,采用特定的载体对酶进行固化,其中的载体是以生物炭和甲壳素作为载体,生物炭是先采用表面活性剂进行分散处理,避免颗粒之间的聚集,然后采用预处理液使其表面引入了较多的氨基,在交联步骤中,将预处理的生物炭与甲壳素在戊二醛的作用下进行交联,使得预处理的生物炭与甲壳素实现了稳定的交联结构,一方面提高了交联载体的吸附性能,实现较多的酶活性中心在交联载体上的均匀分布,充分发挥酶的催化活性,提高了对于酶的固定化性能,从而使得酶解步骤更加充分,提高了螺旋藻多糖的得率和总糖量;另一方面交联载体的稳定结构,增强了功能酶的稳定性能,从而使得功能酶在多次重复使用后,仍然保证稳定的高活性和高催化性能,重复使用性能佳;

[0040] 2.采用本发明提取螺旋藻多糖的方法,得率为9.28-9.33%,总糖含量为67.6-68.1%;

[0041] 3.对本发明制得的功能酶进行回收处理,具体是在分离步骤中,将酶解液离心后,采用纯化水对沉淀进行洗涤,在温度为58℃,真空度为0.08MPa下干燥8.0h,然后重复使用20次,并且在每次使用后均进行回收处理,测得第20次提取的螺旋藻多糖,得率为9.10-9.24%,总糖含量为66.0-67.2%。

具体实施方式

[0042] 为了对本发明的技术特征、目的和效果更加清楚的理解,现说明本发明的具体实施方式。

[0043] 实施例1

[0044] 1.破壁处理

[0045] 将10g螺旋藻干粉置于300g去离子水中,加入0.12g单甘油脂肪酸酯,搅拌1.0h,然后进行均质处理,均质时间为5min,均质压力为6.5MPa,均质次数为3次,均质处理结束后,加入12wt%氢氧化钠溶液,控制pH值为10,在80℃下水浴6.0h,制得螺旋藻多糖提取液;

[0046] 2.酶解

[0047] 向4.1kg螺旋藻多糖提取液中加入10wt%盐酸溶液,调节pH为6.3,然后加入3.6g功能酶进行超声处理,超声时间为25min,超声功率为85W,超声频率为23kHz,超声处理结束后,以2.0℃/min速率升温至52℃进行酶解,酶解时间为10h,酶解结束后,制得酶解液;

[0048] 所述功能酶的制备方法,包括以下步骤:

[0049] (1) 生物炭预处理

[0050] 将10.5g生物炭置于密闭容器中,喷淋84g预分散液,喷淋的同时控制温度为45℃,搅拌转速为220rpm,控制喷淋速率为4.0g/min,喷淋结束后,在80℃下干燥6.0h,制得预分散生物炭;将10.0g预分散生物炭置于500mL 预处理液中,室温下进行搅拌反应,反应时间为10h,搅拌转速为200rpm,搅拌结束后,经过滤洗涤干燥后,制得预处理生物炭;

[0051] 所述生物炭的粒径为150nm;

[0052] 所述预分散液为32wt%乙醇溶液、鼠李糖脂和蔗糖脂肪酸酯的混合液,所述32wt%乙醇溶液、鼠李糖脂和蔗糖脂肪酸酯的质量比为80:1.3:1.7;

[0053] 所述预处理液是由去离子水、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐和盐酸多巴胺混合均匀制得,所述去离子水、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐和盐酸多巴胺的质量比为500:0.65:2.2;

[0054] (2) 交联

[0055] 将10.2g甲壳素置于100g酸液中,升高温度至52℃,进行超声处理,超声时间为20min,超声功率为230W,超声频率为17kHz,超声结束后,以2.0℃/min速率升温至82℃,在氮气气氛下进行球磨处理,球磨时间为1.5h,球磨转速为120rpm,球料比为4:1,球磨结束后,经过滤洗涤干燥,制得预处理甲壳素;将3.6g预处理甲壳素和3.0g预处理生物炭置于120g去离子水中,搅拌均匀后加入60mL戊二醛溶液,室温下搅拌4.0h,搅拌结束后,经静置离心洗涤后,进行冷冻干燥,干燥温度为-32℃,干燥时间为12h,干燥结束后,自然恢复至室温,制得交联载体;

[0056] 所述甲壳素的长度为200nm,宽度为40nm;

[0057] 所述酸液为盐酸、水杨酸和去离子水的混合物,所述盐酸、水杨酸和去离子水的质量比为5.1:2.0:52;

[0058] 所述戊二醛溶液的质量浓度为3.5%;

[0059] (3) 负载

[0060] 将1.3g交联载体置于17.5g去离子水中,升高温度至60℃,加入0.7g木瓜蛋白酶,进行搅拌,搅拌转速是170rpm,搅拌时间为2.3h,搅拌结束后,离心后在60℃下干燥8.0h,制得功能酶;

[0061] 3. 分离

[0062] 将酶解液进行离心处理,离心转速为2700rpm,离心时间为14min,离心结束后将上清液进行浓缩,浓缩至上清液原体积的1/4,浓缩温度为73℃,真空度为0.082MPa,浓缩结束后,冷却至室温,得到浓缩液。

[0063] 4. 纯化

[0064] 将浓缩液与7倍体积的95wt%乙醇溶液混合,静置12h,离心后,得到一次上清液和一次沉淀,一次沉淀用3倍质量的无水乙醇洗涤、滤干,得到湿态固体一;将一次上清液与5倍体积的95wt%乙醇溶液混合,静置12h后进行离心,得到二次上清液和二次沉淀,将二次沉淀用3倍质量的无水乙醇洗涤并滤干,得到湿态固体二;将湿态固体一和湿态固体二混合后进行真空干燥,干燥温度为60℃,真空度为0.090MPa,干燥时间为8.2h,干燥结束后,制得螺旋藻多糖。

[0065] 采用实施例1提取螺旋藻多糖的方法,得率为9.33%,总糖含量为68.1%,其中得率=(螺旋藻多糖重量g/螺旋藻干粉重量g)×100%;

[0066] 对实施例1的功能酶进行回收处理,具体是在分离步骤中,将酶解液离心后,采用纯化水对沉淀进行洗涤,在温度为58℃,真空度为0.08MPa下干燥8.0h,然后采用实施例1的方法重复使用20次,并且在每次使用后均进行回收处理,测得第20次提取的螺旋藻多糖,得率为9.24%,总糖含量为67.2%。

[0067] 实施例2

[0068] 1.破壁处理

[0069] 将8g螺旋藻干粉置于290g去离子水中,加入0.10g单甘油脂肪酸酯,搅拌0.8h,然后进行均质处理,均质时间为4min,均质压力为6.2MPa,均质次数为3次,均质处理结束后,加入10wt%氢氧化钠溶液,控制pH值为9.8,在78℃下水浴5.8h,制得螺旋藻多糖提取液;

[0070] 2.酶解

[0071] 向4.0kg螺旋藻多糖提取液中加入8wt%盐酸溶液,调节pH为6.1,然后加入3.5g功能酶进行超声处理,超声时间为23min,超声功率为83W,超声频率为20kHz,超声处理结束后,以1.7℃/min速率升温至50℃进行酶解,酶解时间为9h,酶解结束后,制得酶解液;

[0072] 所述功能酶的制备方法,包括以下步骤:

[0073] (1)生物炭预处理

[0074] 将10.3g生物炭置于密闭容器中,喷淋82g预分散液,喷淋的同时控制温度为43℃,搅拌转速为210rpm,控制喷淋速率为3.7g/min,喷淋结束后,在78℃下干燥5.8h,制得预分散生物炭;将9.6g预分散生物炭置于490mL 预处理液中,室温下进行搅拌反应,反应时间为9.8h,搅拌转速为195rpm,搅拌结束后,经过滤洗涤干燥后,制得预处理生物炭;

[0075] 所述生物炭的粒径为145nm;

[0076] 所述预分散液为30wt%乙醇溶液、鼠李糖脂和蔗糖脂肪酸酯的混合液,所述30wt%乙醇溶液、鼠李糖脂和蔗糖脂肪酸酯的质量比为78:1.1:1.5;

[0077] 所述预处理液是由去离子水、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐和盐酸多巴胺混合均匀制得,所述去离子水、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐和盐酸多巴胺的质量比为495:0.63:2.1;

[0078] (2)交联

[0079] 将10.0g甲壳素置于96g酸液中,升高温度至50℃,进行超声处理,超声时间为18min,超声功率为226W,超声频率为15kHz,超声结束后,以1.8℃/min速率升温至80℃,在氮气气氛下进行球磨处理,球磨时间为1.4h,球磨转速为116rpm,球料比为3:1,球磨结束后,经过滤洗涤干燥,制得预处理甲壳素;将3.4g预处理甲壳素和2.7g预处理生物炭置于115g去离子水中,搅拌均匀后加入58mL戊二醛溶液,室温下搅拌3.8h,搅拌结束后,经静置离心洗涤后,进行冷冻干燥,干燥温度为-34℃,干燥时间为10h,干燥结束后,自然恢复至室温,制得交联载体;

[0080] 所述甲壳素的长度为190nm,宽度为35nm;

[0081] 所述酸液为盐酸、水杨酸和去离子水的混合物,所述盐酸、水杨酸和去离子水的质量比为5.0:1.8:50;

[0082] 所述戊二醛溶液的质量浓度为3.4%;

[0083] (3)负载

[0084] 将1.1g交联载体置于17.1g去离子水中,升高温度至58℃,加入0.6g木瓜蛋白酶,进行搅拌,搅拌转速是163rpm,搅拌时间为2.0h,搅拌结束后,离心后在58℃下干燥8.4h,制

得功能酶；

[0085] 3. 分离

[0086] 将酶解液进行离心处理,离心转速为2680rpm,离心时间为17min,离心结束后将上清液进行浓缩,浓缩至上清液原体积的1/4,浓缩温度为72℃,真空度为0.080MPa,浓缩结束后,冷却至室温,得到浓缩液。

[0087] 4. 纯化

[0088] 将浓缩液与6倍体积的93wt%乙醇溶液混合,静置11h,离心后,得到一次上清液和一次沉淀,一次沉淀用2.5倍质量的无水乙醇洗涤、滤干,得到湿态固体一;将一次上清液与4.8倍体积的93wt%乙醇溶液混合,静置10h后进行离心,得到二次上清液和二次沉淀,将二次沉淀用2.5倍质量的无水乙醇洗涤并滤干,得到湿态固体二;将湿态固体一和湿态固体二混合后进行真空干燥,干燥温度为58℃,真空度为0.088MPa,干燥时间为8.4h,干燥结束后,制得螺旋藻多糖。

[0089] 采用实施例2提取螺旋藻多糖的方法,得率为9.28%,总糖含量为67.6%,其中得率=(螺旋藻多糖重量g/螺旋藻干粉重量g)×100%;

[0090] 对实施例2的功能酶进行回收处理,具体是在分离步骤中,将酶解液离心后,采用纯化水对沉淀进行洗涤,在温度为58℃,真空度为0.08MPa下干燥8.0h,然后采用实施例2的方法重复使用20次,并且在每次使用后均进行回收处理,测得第20次提取的螺旋藻多糖,得率为9.10%,总糖含量为66.0%。

[0091] 实施例3

[0092] 1. 破壁处理

[0093] 将12g螺旋藻干粉置于310g去离子水中,加入0.14g单甘油脂肪酸酯,搅拌1.2h,然后进行均质处理,均质时间为6min,均质压力为6.7MPa,均质次数为3次,均质处理结束后,加入14wt%氢氧化钠溶液,控制pH值为10.2,在82℃下水浴6.2h,制得螺旋藻多糖提取液;

[0094] 2. 酶解

[0095] 向4.2kg螺旋藻多糖提取液中加入12wt%盐酸溶液,调节pH为6.4,然后加入3.7g功能酶进行超声处理,超声时间为27min,超声功率为88W,超声频率为25kHz,超声处理结束后,以2.2℃/min速率升温至54℃进行酶解,酶解时间为12h,酶解结束后,制得酶解液;

[0096] 所述功能酶的制备方法,包括以下步骤:

[0097] (1) 生物炭预处理

[0098] 将10.7g生物炭置于密闭容器中,喷淋86g预分散液,喷淋的同时控制温度为47℃,搅拌转速为230rpm,控制喷淋速率为4.2g/min,喷淋结束后,在82℃下干燥6.2h,制得预分散生物炭;将10.3g预分散生物炭置于508mL 预处理液中,室温下进行搅拌反应,反应时间为10.3h,搅拌转速为206rpm,搅拌结束后,经过滤洗涤干燥后,制得预处理生物炭;

[0099] 所述生物炭的粒径为155nm;

[0100] 所述预分散液为34wt%乙醇溶液、鼠李糖脂和蔗糖脂肪酸酯的混合液,所述34wt%乙醇溶液、鼠李糖脂和蔗糖脂肪酸酯的质量比为83:1.5:1.8;

[0101] 所述预处理液是由去离子水、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐和盐酸多巴胺混合均匀制得,所述去离子水、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐和盐酸多巴胺的质量比为505:0.67:2.3;

[0102] (2) 交联

[0103] 将10.5g甲壳素置于105g酸液中,升高温度至54℃,进行超声处理,超声时间为22min,超声功率为235W,超声频率为20kHz,超声结束后,以2.2℃/min速率升温至84℃,在氮气气氛下进行球磨处理,球磨时间为1.6h,球磨转速为124rpm,球料比为5:1,球磨结束后,经过滤洗涤干燥,制得预处理甲壳素;将3.8g预处理甲壳素和3.3g预处理生物炭置于124g去离子水中,搅拌均匀后加入63mL戊二醛溶液,室温下搅拌4.2h,搅拌结束后,经静置离心洗涤后,进行冷冻干燥,干燥温度为-30℃,干燥时间为13h,干燥结束后,自然恢复至室温,制得交联载体;

[0104] 所述甲壳素的长度为210nm,宽度为45nm;

[0105] 所述酸液为盐酸、水杨酸和去离子水的混合物,所述盐酸、水杨酸和去离子水的质量比为5.2:2.2:55;

[0106] 所述戊二醛溶液的质量浓度为3.7%;

[0107] (3) 负载

[0108] 将1.5g交联载体置于17.8g去离子水中,升高温度至62℃,加入0.8g木瓜蛋白酶,进行搅拌,搅拌转速是175rpm,搅拌时间为2.5h,搅拌结束后,离心后在63℃下干燥7.8h,制得功能酶;

[0109] 3. 分离

[0110] 将酶解液进行离心处理,离心转速为2730rpm,离心时间为12min,离心结束后将上清液进行浓缩,浓缩至上清液原体积的1/4,浓缩温度为75℃,真空度为0.084MPa,浓缩结束后,冷却至室温,得到浓缩液。

[0111] 4. 纯化

[0112] 将浓缩液与8倍体积的97wt%乙醇溶液混合,静置13h,离心后,得到一次上清液和一次沉淀,一次沉淀用3.5倍质量的无水乙醇洗涤、滤干,得到湿态固体一;将一次上清液与5.2倍体积的97wt%乙醇溶液混合,静置13h后进行离心,得到二次上清液和二次沉淀,将二次沉淀用3.5倍质量的无水乙醇洗涤并滤干,得到湿态固体二;将湿态固体一和湿态固体二混合后进行真空干燥,干燥温度为62℃,真空度为0.093MPa,干燥时间为8.0h,干燥结束后,制得螺旋藻多糖。

[0113] 采用实施例3提取螺旋藻多糖的方法,得率为9.30%,总糖含量为67.9%,其中得率=(螺旋藻多糖重量g/螺旋藻干粉重量g)×100%;

[0114] 对实施例3的功能酶进行回收处理,具体是在分离步骤中,将酶解液离心后,采用纯化水对沉淀进行洗涤,在温度为58℃,真空度为0.08MPa下干燥8.0h,然后采用实施例3的方法重复使用20次,并且在每次使用后均进行回收处理,测得第20次提取的螺旋藻多糖,得率为9.16%,总糖含量为66.5%。

[0115] 对比例1

[0116] 在实施例1的基础上,改变之处为,

[0117] 在酶解过程功能酶的制备方法中,省略生物炭预处理步骤;

[0118] 在交联步骤中,将预处理生物炭等量替换为未经任何处理的生物炭,所述生物炭的粒径为150nm;

[0119] 其余操作均相同。

[0120] 采用对比例1提取螺旋藻多糖的方法,得率为8.11%,总糖含量为56.6%,其中得率=

(螺旋藻多糖重量g/螺旋藻干粉重量g) × 100%;

[0121] 对对比比例1的功能酶进行回收处理,具体是在分离步骤中,将酶解液离心后,采用纯化水对沉淀进行洗涤,在温度为58℃,真空度为0.08MPa下干燥8.0h,然后采用对比比例1的方法重复使用20次,并且在每次使用后均进行回收处理,测得第20次提取的螺旋藻多糖,得率为7.04%,总糖含量为47.7%。

[0122] 对比比例2

[0123] 在实施例1的基础上,改变之处为,在酶解过程功能酶的制备方法中,

[0124] 在交联步骤中,省略预处理甲壳素的成分,将预处理甲壳素等量替换为预处理生物炭成分;

[0125] 其余操作均相同。

[0126] 采用对比比例2提取螺旋藻多糖的方法,得率为8.54%,总糖含量为60.3%,其中得率=(螺旋藻多糖重量g/螺旋藻干粉重量g) × 100%;

[0127] 对对比比例2的功能酶进行回收处理,具体是在分离步骤中,将酶解液离心后,采用纯化水对沉淀进行洗涤,在温度为58℃,真空度为0.08MPa下干燥8.0h,然后采用对比比例2的方法重复使用20次,并且在每次使用后均进行回收处理,测得第20次提取的螺旋藻多糖,得率为7.55%,总糖含量为52.8%。

[0128] 本发明采用酶解的方法对螺旋藻多糖进行提取,采用特定的载体对酶进行固化,其中的载体是以生物炭和甲壳素作为载体,生物炭是先采用表面活性剂进行分散处理,避免颗粒之间的聚集,然后采用预处理液使其表面引入了较多的氨基,在交联步骤中,将预处理的生物炭与甲壳素在戊二醛的作用下进行交联,使得预处理的生物炭与甲壳素实现了稳定的交联结构,一方面提高了交联载体的吸附性能,实现较多的酶活性中心在交联载体上的均匀分布,充分发挥酶的催化活性,提高了对于酶的固定化性能,从而使得酶解步骤更加充分,提高了螺旋藻多糖的得率和总糖量;另一方面交联载体的稳定结构,增强了功能酶的稳定性能,从而使得功能酶在多次重复使用后,仍然保证稳定的高活性和高催化性能,重复使用性能佳。

[0129] 对比比例1省略了生物炭的预处理步骤,在交联步骤中直接采用未经任何处理的生物炭与甲壳素进行交联,生物炭的分散性能差,聚集较为严重,并且其表面并未引入氨基基团,其无法与甲壳素进行有效的交联,进而影响了交联载体的稳定性和分散性能,降低对于酶活性中心的负载性能,酶在交联载体上的分布不均匀,影响了酶的催化活性,从而影响了酶解步骤,最终降低了产品得率和总糖含量,并且重复使用性能较差;

[0130] 对比比例2在交联步骤中省略了甲壳素,仅是采用生物炭与戊二醛进行交联,其降低了负载效率,减弱了对于酶的负载性能,其得到的载体结构稳定性不强,使得功能酶的循环使用性能不佳,最终影响了产品得率。

[0131] 除非另有说明,本发明中所采用的百分数均为质量百分数。

[0132] 最后应说明的是:以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,对于本领域的技术人员来说,其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。