



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105601732 A

(43) 申请公布日 2016. 05. 25

(21) 申请号 201610192773. 3

(22) 申请日 2016. 03. 30

(71) 申请人 南通中国科学院海洋研究所海洋科学与技术研究发展中心

地址 226004 江苏省南通市崇川区崇川路58号

申请人 中国科学院海洋研究所

(72) 发明人 王广策 牛建峰 黄爱优

(74) 专利代理机构 苏州华博知识产权代理有限公司 32232

代理人 靳苗静

(51) Int. Cl.

C07K 14/795(2006. 01)

C07K 1/18(2006. 01)

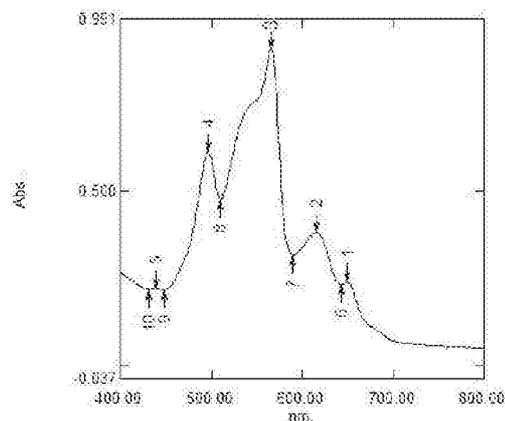
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

从紫菜加工废水中分离藻胆蛋白的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种从紫菜加工废水中分离藻胆蛋白的方法,所述方法包括以下步骤:1) 先将紫菜加工废水过滤除去杂质,得到除去杂质后的紫菜加工废水;2) 再用离子交换填料吸附所述除去杂质后的紫菜加工废水中的藻胆蛋白,得到吸附有藻胆蛋白的离子交换填料;3) 最后用0.1~0.5M的氯化钠-PBS缓冲液洗脱所述吸附有藻胆蛋白的离子交换填料,得到纯化后的藻胆蛋白。本发明的方法从紫菜加工废水中回收纯化活性高值的藻胆蛋白,达到了废物利用的目的,同时由于藻胆蛋白的提取,降低了紫菜加工废水直接排放对环境的污染。



1. 一种从紫菜加工废水中分离藻胆蛋白的方法,所述方法包括以下步骤:

1) 先将紫菜加工废水过滤除去杂质,得到除去杂质后的紫菜加工废水;

2) 再用离子交换填料吸附所述除去杂质后的紫菜加工废水中的藻胆蛋白,得到吸附有藻胆蛋白的离子交换填料;

3) 最后用0.1~0.5M的氯化钠-PBS缓冲液洗脱所述吸附有藻胆蛋白的离子交换填料,得到纯化后的藻胆蛋白。

2. 根据权利要求1所述的从紫菜加工废水中分离藻胆蛋白的方法,其特征在于,在步骤3)中,用0.2~0.3M的氯化钠-PBS缓冲液洗脱所述吸附有藻胆蛋白的离子交换填料。

3. 根据权利要求2所述的从紫菜加工废水中分离藻胆蛋白的方法,其特征在于,在步骤1)中,将紫菜加工废水用过滤介质过滤除去杂质。

4. 根据权利要求3所述的从紫菜加工废水中分离藻胆蛋白的方法,其特征在于,所述过滤介质为滤布或筛绢。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的从紫菜加工废水中分离藻胆蛋白的方法,其特征在于,在步骤2)中,用紫菜加工废水的1~5体积%的离子交换填料吸附所述除去杂质后的紫菜加工废水中的藻胆蛋白。

6. 根据权利要求5所述的从紫菜加工废水中分离藻胆蛋白的方法,其特征在于,所述离子交换填料为阴离子交换填料。

7. 根据权利要求6所述的从紫菜加工废水中分离藻胆蛋白的方法,其特征在于,所述阴离子交换填料为Q-琼脂糖凝胶。

8. 根据权利要求1至4中任一项所述的从紫菜加工废水中分离藻胆蛋白的方法,其特征在于,在步骤2)中,所述离子交换填料吸附所述除去杂质后的紫菜加工废水中的藻胆蛋白前,还包括将所述离子交换填料进行清洗的步骤。

9. 根据权利要求8所述的从紫菜加工废水中分离藻胆蛋白的方法,其特征在于,所述离子交换填料通过包括以下步骤的方法进行清洗:将所述离子交换填料用水洗涤三次,静置,然后再吸去离子交换填料上多余的水分。

10. 根据权利要求1至4中任一项所述的从紫菜加工废水中分离藻胆蛋白的方法,其特征在于,在步骤2)中,得到吸附有藻胆蛋白的离子交换填料后,还包括将所述吸附有藻胆蛋白的离子交换填料用水进行清洗的步骤。

从紫菜加工废水中分离藻胆蛋白的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种分离藻胆蛋白的方法,具体涉及一种从紫菜加工废水中分离藻胆蛋白的方法。

背景技术

[0002] 紫菜具有重要经济价值,是我国主要经济海藻之一。我国主要栽培的紫菜品种有坛紫菜和条斑紫菜,其中坛紫菜主要栽培于长江以南(福建省和广东省),条斑紫菜主要栽培于长江以北(江苏省和山东省,主要是在南通、盐城和连云港海区)。据统计,2006年紫菜年产量约 1.8×10^4 吨干品,年产值估计约13亿美元(FAO,2006)。

[0003] 藻胆蛋白是一种水溶性色素蛋白,具有独特的吸收光谱和荧光发射光谱。藻胆蛋白包括藻红蛋白、藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白。藻胆蛋白由脱辅基蛋白和四吡咯结构的色素通过硫醚键共价结合在一起,结构稳定,可以作为荧光探针,用于生物、医学研究以及疾病的临床诊断与治疗等。藻胆蛋白还可作为天然色素用作食品、化妆品的添加剂,避免了化学合成色素可能带来的毒害。研究表明,藻胆蛋白能显著提高人体淋巴细胞活性和机体免疫功能,增强机体的防病抗癌能力。因此,国外的许多公司相继投资开发藻胆蛋白产品,产品售价十分可观。据统计,这类产品在国际市场上大约有超过100亿美元的市场机会。目前,国内也已经使用这些产品,但全部依赖进口。藻胆蛋白价格高昂的主要原因是因为分离纯化困难,所以发展新的纯化技术是研究的重点之一。

[0004] 条斑紫菜加工包括一次加工和二次加工,一次加工过程包括清洗、切碎、洗净-调合-制饼-脱水-烘干-剥离、分选和包装等。切碎的条斑紫菜经清洗过程后,由于切口处细胞破裂,胞内物质释放出来,产生的大量废水中富含藻胆蛋白,呈红色,俗称“红水”。“红水”由于色度超标,直接排放不仅会浪费资源,还会增加环境负担。如果能从中分离回收藻胆蛋白再进行排放,不仅可降低紫菜加工废水色度,减轻“红水排放”对环境的污染,还可获得高值产物藻胆蛋白,有利于紫菜产业健康可持续发展。

发明内容

[0005] 为解决上述技术问题,本发明的目的在于提供一种从紫菜加工废水中分离藻胆蛋白的方法,从而从紫菜加工废水中回收纯化活性高值的藻胆蛋白,达到了废物利用的目的,同时由于藻胆蛋白的提取,降低了紫菜加工废水直接排放对环境的污染。

[0006] 为达到上述目的,本发明的技术方案如下:

[0007] 本发明提供一种从紫菜加工废水中分离藻胆蛋白的方法,所述方法包括以下步骤:

[0008] 1)先将紫菜加工废水过滤除去杂质,得到除去杂质后的紫菜加工废水;

[0009] 2)再用离子交换填料吸附所述除去杂质后的紫菜加工废水中的藻胆蛋白,得到吸附有藻胆蛋白的离子交换填料;

[0010] 3)最后用0.1~0.5M的氯化钠-PBS缓冲液洗脱所述吸附有藻胆蛋白的离子交换填

料,得到纯化后的藻胆蛋白。

[0011] 优选地,在步骤3)中,用0.2~0.3M的氯化钠-PBS缓冲液洗脱所述吸附有藻胆蛋白的离子交换填料,能够有效地吸附藻胆蛋白,并且纯度较高。

[0012] 优选地,在步骤1)中,将紫菜加工废水用过滤介质过滤除去杂质。

[0013] 更优选地,所述过滤介质为滤布或筛绢。

[0014] 优选地,在步骤2)中,用紫菜加工废水的1~5体积%的离子交换填料吸附所述除去杂质后的紫菜加工废水中的藻胆蛋白,能够更有效地吸附藻胆蛋白,且节约成本。

[0015] 优选地,所述离子交换填料为阴离子交换填料。

[0016] 优选地,所述阴离子交换填料为Q-琼脂糖凝胶(Q-sepharose)。

[0017] 优选地,在步骤2)中,所述离子交换填料吸附所述除去杂质后的紫菜加工废水中的藻胆蛋白前,还包括将所述离子交换填料进行清洗的步骤。

[0018] 优选地,所述离子交换填料通过包括以下步骤的方法进行清洗:将所述离子交换填料用水洗涤三次,静置,然后再吸去离子交换填料上多余的水分。

[0019] 优选地,在步骤2)中,得到吸附有藻胆蛋白的离子交换填料后,还包括将所述吸附有藻胆蛋白的离子交换填料用水进行清洗的步骤。

[0020] 本发明从紫菜加工废水中回收纯化活性高值藻胆蛋白,达到了废物利用的目的,同时由于藻胆蛋白的提取,降低了紫菜加工废水直接排放对环境的污染;Q-琼脂糖凝胶填料可重复利用,成本低;操作简便,工艺简单,分离速度快,充分利用了紫菜加工废水,获得高值藻胆蛋白的同时减轻了紫菜加工废水对环境的污染,实现了资源的重复利用。

[0021] 本发明具有如下优点:

[0022] 1.操作过程简单,紫菜加工废水仅需用过滤介质过滤去除紫菜残渣、污泥等颗粒性杂质,藻胆蛋白分离前不需进行预处理。

[0023] 2.本发明用蛋白提取后的Q-琼脂糖凝胶(Q-sepharose)填料可经洗涤后重复利用,成本低。

[0024] 3.藻胆蛋白分离速度快,一个完整的分离过程仅需要约1小时,包括柱的平衡所需之10分钟,上样30分钟,清洗10分钟,洗脱10分钟。

[0025] 4.本发明的纯化后的藻胆蛋白产率为0.98mg/L以上,通过本发明可大大提高紫菜加工废水的利用率。

附图说明

[0026] 图1为本发明中用于分离的紫菜加工废水的粗蛋白液在400-800nm的吸收光谱图;

[0027] 图2为本发明中分离洗脱得到的藻胆蛋白在400-800nm的吸收光谱图。

具体实施方式

[0028] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。此外应理解,在阅读了本发明的内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本发明所限定的范围。

[0029] 除非特别指明,以下实施例中所用的试剂均可从正规渠道商购获得。

[0030] 实施例1

[0031] 1.量取200ml紫菜加工废水,以筛绢滤去紫菜残渣、污泥等杂质,得到粗蛋白液,放在250ml蓝盖瓶中,置于4℃冰箱备用。

[0032] 2.按照公式蛋白(Pro)=OD₅₆₂/0.0157,计算得粗蛋白液中蛋白含量为4.39mg/L,并于室温下采用紫外分光光度计测定提取的粗蛋白液的吸收光谱,图1为粗蛋白液在400-800nm的吸收光谱,图中400-450nm处有很多吸收峰,说明杂蛋白很多。

[0033] 3.取2ml存于酒精中的Q-琼脂糖凝胶(Q-selpharose)填料到50ml离心管,加入10倍体积的蒸馏水,晃动使Q-琼脂糖凝胶(Q-selpharose)填料散开。静置,使Q-琼脂糖凝胶(Q-selpharose)填料下沉。将上清吸出。重复三次,以充分去除酒精。

[0034] 4.于20℃将洗去酒精的Q-琼脂糖凝胶(Q-selpharose)填料加入到粗蛋白液中,快速晃动,使藻胆蛋白吸附至Q-琼脂糖凝胶(Q-selpharose)填料上。

[0035] 5.静置使填料沉降,弃上清。将吸附了藻胆蛋白的Q-琼脂糖凝胶(Q-selpharose)填料转移到10ml离心管,用10ml蒸馏水洗涤。6.分别以10ml磷酸缓冲液配制的0.1M、0.2M、0.3M的氯化钠溶液洗脱藻胆蛋白。并于室温下采用紫外分光光度计测定提取的藻胆蛋白的吸收光谱,图2为洗脱得到的藻胆蛋白在400-800nm的吸收光谱,根据藻红蛋白、藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白吸收波长范围(参见:Niu J F,Wang G C,Lin X Z,et al.Large-scale recovery of C-phycoyanin from Spirulina platensis using expanded bed adsorption chromatography[J].Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical&Life Sciences,2007,850(1-2):267-276.),可知图中峰1为别藻蓝蛋白,峰2为藻蓝蛋白,峰3和峰4为藻红蛋白,说明分离纯化后的藻胆蛋白纯度较高。

[0036] 7.以BAC蛋白测定试剂盒测定粗蛋白液、Q-琼脂糖凝胶(Q-selpharose)填料吸附了藻胆蛋白后的废液及洗脱所得藻胆蛋白的蛋白浓度,见表1。粗蛋白液总蛋白含量为878μg,纯化所得藻胆蛋白总蛋白量为197μg,产率为0.98mg/L。

[0037] 表1紫菜加工废水吸附前后及洗脱液体积及蛋白浓度

[0038]

	体积 (ml)	蛋白浓度(μg /ml)	蛋白含量 (μg)	回收率
吸附前	200	4.49	878	22%
吸附后	200	1.46	292	
洗脱液	20	9.87	197	

[0039] 实施例2

[0040] 1.量取1L紫菜加工废水,以滤布滤去紫菜残渣、污泥等杂质,得到粗蛋白液,放在底部带有通气口的1L圆形瓶中,置于4℃冰箱备用。

[0041] 2.按照公式蛋白浓度(mg/L)=OD₅₆₂/0.0157,计算得粗蛋白液中蛋白含量为4.39mg/L。

[0042] 3.取20ml存于酒精中的Q-琼脂糖凝胶(Q-selpharose)填料到500ml的取样瓶中,

加入10倍体积的蒸馏水,晃动使Q-琼脂糖凝胶(Q-sepharose)填料散开。静置,使填料下沉。将上清吸出。重复三次,以充分去除酒精。

[0043] 4.于25℃,将洗去酒精的Q-琼脂糖凝胶(Q-sepharose)填料加入到粗蛋白液中,底部通气将Q-琼脂糖凝胶(Q-sepharose)填料吹起,使藻胆蛋白与Q-琼脂糖凝胶(Q-sepharose)填料充分接触,便于藻胆蛋白吸附至Q-琼脂糖凝胶(Q-sepharose)填料上。

[0044] 5.静置使Q-琼脂糖凝胶(Q-sepharose)填料沉降,弃上清。将吸附了藻胆蛋白的Q-琼脂糖凝胶(Q-sepharose)填料转移到500ml的取样瓶,用200ml蒸馏水洗涤。

[0045] 6.分别以50ml磷酸缓冲液配制的0.1M、0.2M、0.3M、0.4M和0.5M的氯化钠溶液洗脱藻胆蛋白。

[0046] 7.以BAC蛋白测定试剂盒测定粗蛋白液、Q-琼脂糖凝胶(Q-sepharose)填料吸附了藻胆蛋白后的废液及洗脱所得藻胆蛋白的蛋白浓度。粗蛋白液总蛋白含量为4.39mg,纯化所得藻胆蛋白总蛋白量为1.05mg,产率为1.05mg/L。

[0047] 本发明可从紫菜加工废水中分离得到高值藻胆蛋白;Q-琼脂糖凝胶(Q-sepharose)填料可重复利用,成本低。本发明操作简便,工艺简单,分离速度快,充分利用了紫菜加工废水,获得高值藻胆蛋白的同时减轻了紫菜加工废水对环境的污染,实现了资源的重复利用。

[0048] 以上所述的仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明创造构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。

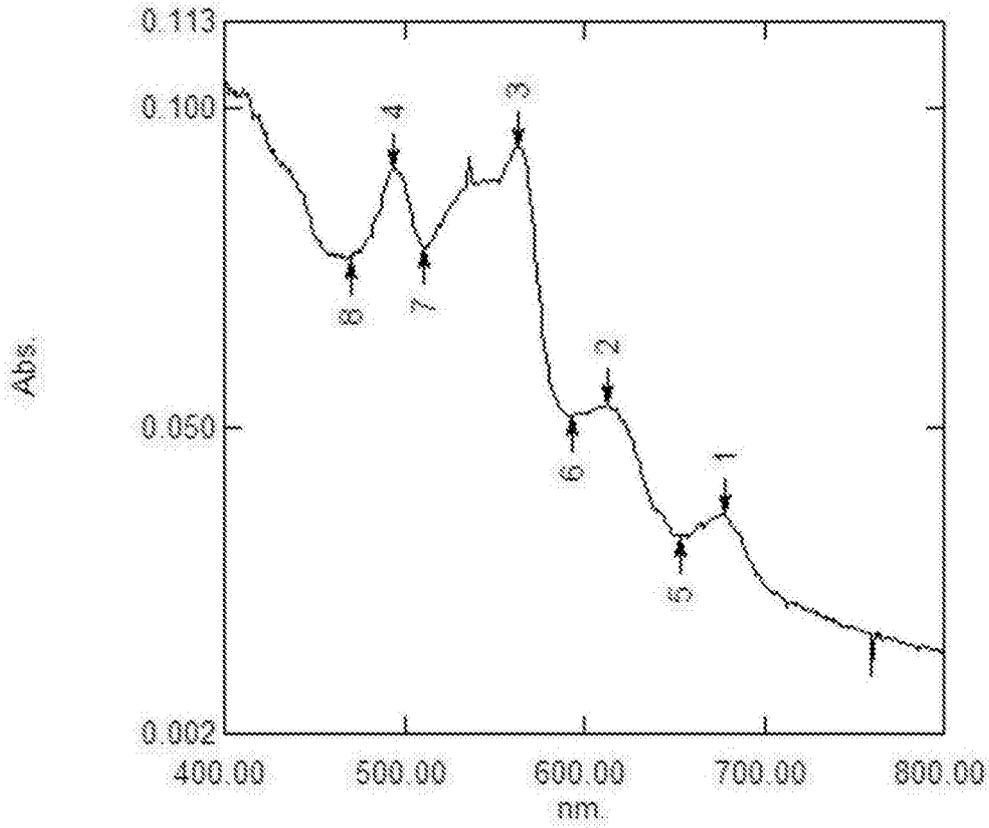


图1

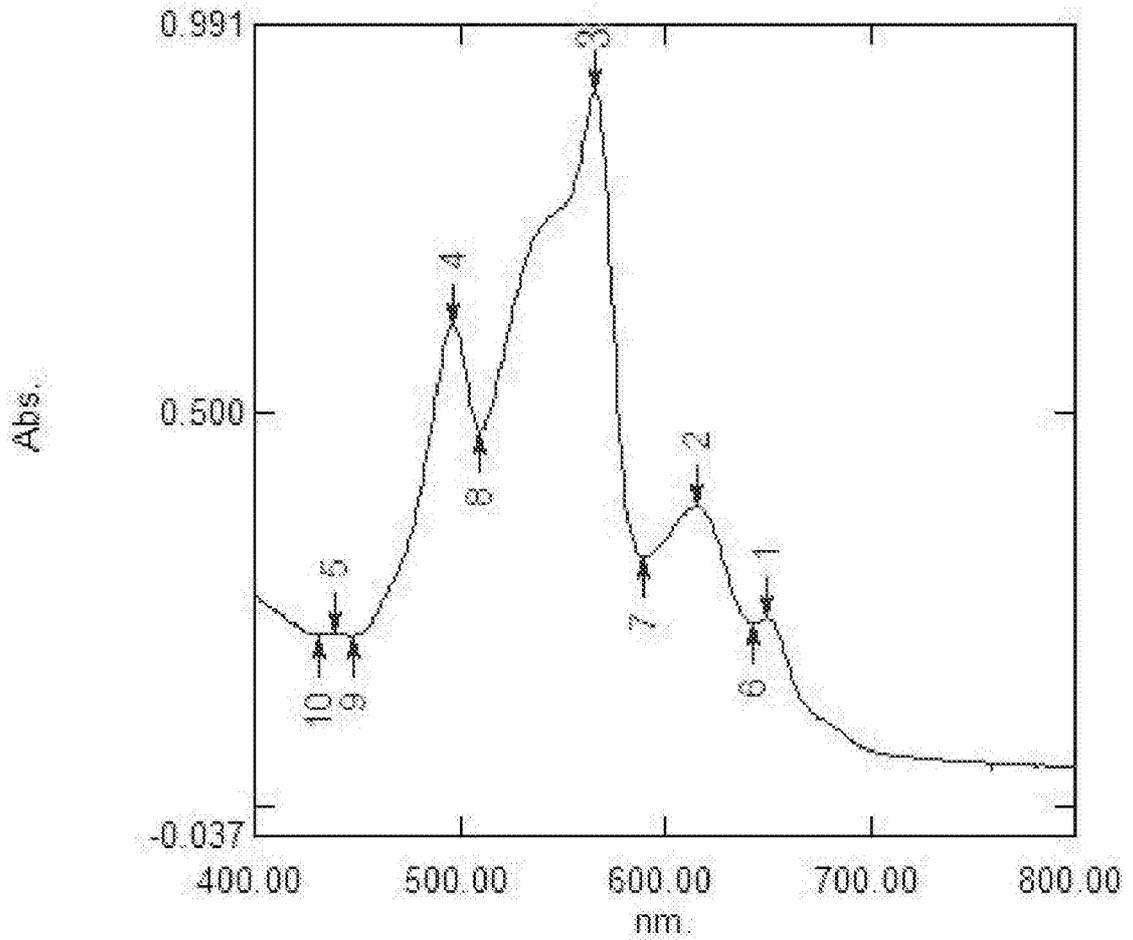


图2