



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104529570 B

(45)授权公告日 2018.03.16

(21)申请号 201410758536.X

审查员 芦谅

(22)申请日 2014.12.10

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104529570 A

(43)申请公布日 2015.04.22

(73)专利权人 济南航晨生物科技有限公司

地址 250000 山东省济南市市中区济大路7号

(72)发明人 李昆仑 赵林 许士明 张娟

孙欣

(74)专利代理机构 济南舜源专利事务所有限公

司 37205

代理人 张汝瑜

(51)Int. Cl.

C05F 11/10(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

一种新型酶法提取海藻中间体的方法

(57)摘要

本发明涉及一种新型酶法提取海藻中间体的方法,步骤为:将干海带充分清洗浸泡后加入酸性溶液中,搅拌均匀得混合物A;将复合酸性酶溶于水后加入混合物A中进行第一轮搅拌提取后,得混合物B;将无机碱性化合物、复合碱性酶溶于水后加入混合物B中进行第二轮搅拌提取后,得混合物C;将保藏剂溶于水中加入混合物C中,搅拌均匀即得海藻中间体。本发明制备海藻中间体高效、快速;温和、全面;且安全,无害,与传统酸碱提取工艺相比,本发明提取效率提高了50%以上,海藻多糖含量提高50-100%,海藻酸含量在3.5-4.0%之间,海藻中间体产品效果显著提升,并将海藻中所有有效成分全部保留在产品中,真正实现全效添加。

1. 一种新型酶法提取海藻中间体的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 称取100-500份干海带,用水洗净后浸泡充分吸水至1000-2000份;

(2) 称取100-500份水,向其中加入1.0-4.5份的有机或无机酸,混匀,得酸性溶液;

所述的有机或无机酸选自磷酸、盐酸、硝酸、亚硝酸、甲酸、醋酸、冰乙酸、硫酸中的一种或两种以上的混合物;

(3) 将步骤(1)获得的1000-2000份的海带加入到步骤(2)的酸性溶液中,得混合物A;

(4) 称取1-25份复合酸性酶、溶于300-600份水中,混合均匀后加入步骤(3)所得的混合物A中,混合均匀,得混合物B;

所述复合酸性酶为酸性木聚糖酶、酸性脂肪酶、酸性胃蛋白酶和酸性核酸外切酶的混合物,其质量配比为3:2:2:1;

(5) 将混合物B在温度为45-55℃条件下,搅拌15-90min;

(6) 将1-80份无机碱性化合物、1-20份复合碱性酶溶于1000-2000份水中,混匀后加入混合物B中,得混合物C;

所述无机碱性化合物选自氢氧化钾、氢氧化钠、硝酸钾、硝酸钠、醋酸钠、醋酸钾、碳酸钾、碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸镁、硫酸钠、硫酸镁中的一种或两种以上的混合物;

所述复合碱性酶为碱性 α -淀粉酶、碱性木聚糖酶、碱性胰蛋白酶和碱性核酸外切酶的混合物,其质量配比为3:2:1:1;

(7) 将混合物C在温度为45-55℃条件下搅拌15-90min;

(8) 将1-100份保藏剂溶于100份的水中,加入混合物C中,40-60℃条件下,搅拌均匀,冷却至室温,即得海藻中间体;

所述的保藏剂选自硫酸铜、硫酸铁、硫酸亚铁、EDTA、EDDHA、ATMP、三聚磷酸钠、柠檬酸钠、酒石酸钾钠、苯甲酸钠、苯甲酸钾、山梨酸钾、山梨酸钠、丙酸钙、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、双乙酸钠、乳酸链球菌素中的一种或两种以上的混合物。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(2)中100份水中加入1.5-3.0份的磷酸。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(8)中的保藏剂为苯甲酸钠、硫酸铜、EDTA和乳酸链球菌素的混合物。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述步骤(8)中的保藏剂为苯甲酸钠、硫酸铜、EDTA和乳酸链球菌素的混合物,其质量比例为4:3:3:1。

5. 如权利要求1-4任一项所述的方法制备的海藻中间体。

6. 如权利要求5所述的海藻中间体在作为或制备肥料方面的应用。

一种新型酶法提取海藻中间体的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种新型酶法提取海藻中间体的方法,属于生物资源提取领域。

背景技术

[0002] 海洋面积占地球表面的70%,生长在海水里的海藻是海洋生物资源的一大家族,有250属,1500余种,海藻富含多种营养成分,包括维生素、多糖、藻朊酸、甘露醇、甜菜碱、高度不饱和脂肪酸、抗生素以及多种天然植物激素等。海藻生物结构简单,利于加工提取活性物质,已被广泛应用于医药、食品、工业、农业等领域。海藻肥是指以海藻或海藻提取物为原料,通过发酵、酸碱工艺或肥料混配工艺生产出来的生物肥。该肥在欧盟IMO、ECOCERT,北美OMIR,日本JAS标准和中国有机食品技术规范中被明确认定为有机农业的应用产品。

[0003] 海藻中间体是由速生大型海藻经特殊方法破碎细胞壁,释放内容物后形成的有机液体肥料,它除保留了海藻中丰富的矿物质及微量元素等营养成分外,还含有许多生物活性物质,其中发现对植物有产物效应的如,酚类化合物、多种生长调节剂等,具有促进作物生长、提高作物产量及品质的作用,已引起国内外的普遍关注。海藻中间体肥料是以海藻提取中间体为核心物质制成的肥料,利用海藻提取中间体可以与大量元素、微量元素等混配制作成新型肥料。其作用体现在:增加作物产量,提高作物品质,促进植物从土壤中吸收无机养分,改善土壤结构,提高种子发芽率,促进根系生长,增强植物对外界胁迫条件的抵抗能力(抗旱、抗寒、耐盐、耐热),还能提高植物自身的免疫力,抵御真菌、害虫的侵袭,延长农作物收获后的保质期。在农业生产过程中,化学肥料和农药不合理的大量施用造成土壤结构破坏,肥力下降,农作物品质降低。海藻中间体肥料能促进植物生长发育,增强植物抗性,促进土壤团粒结构的形成,对环境无污染,符合当今国内外肥料多元高效化、复合专用化、长效多功能化和绿色环保化发展的总趋势。这类新型肥料在农业上的应用是维护农田生态平衡、改善农业生态系统、实现农业可持续发展的有效手段。

[0004] 传统的海藻中间体提取工艺有:碱提取法、酸提取法。其中,碱提取法提取出来的海藻提取物一般呈碱性,品相粗糙,且除海藻酸外其他功能成分破坏严重,施用过程中需调整pH值。酸提取法在高温高压下进行,对功效成分包括海藻酸破坏严重。目前国内大多数厂家主要采用碱提取法,即采用碱性试剂在70-80℃条件下对海藻进行化学提取,海藻多糖含量仅为1.0-2.5%。

[0005] 本发明是以生物酶工程技术为核心,针对海洋生物肥料需求而设计的海藻中间体无损、绿色、环保提取新工艺。

[0006] 经我方仔细考察,国内目前虽有此类文献资料报道,但均处于理论研究水平,且多为阶段性研究成果,尚未有报道复合酶提取法工业化生产的完整工艺研究,更未发现国内目前有企业将此技术实现产业化,因此本项目在同行业领域内具有示范性作用,可以带来巨大的经济利益和行业影响力。本技术符合国家绿色农业与可持续发展策略,符合国家越来越重视的资源回收与再利用方针,因此开发前景广阔。

发明内容

[0007] 针对现有技术中的问题,本发明提供了一种新型酶法提取海藻中间体的方法,通过本发明制备海藻中间体高效、快速;温和、全面;且安全,无害。本发明的技术方案如下:

[0008] 一种新型酶法提取海藻中间体的方法,包括以下步骤:

[0009] (1) 称取100-500份干海带,用水洗净后浸泡充分吸水至1000-2000份;

[0010] (2) 称取100-500份水,向其中加入1.0-4.5份的有机或无机酸,混匀,得酸性溶液;优选的,100份水中加入1.5-3.0份的磷酸;

[0011] 所述的有机或无机酸选自磷酸、盐酸、硝酸、亚硝酸、甲酸、醋酸、冰乙酸、硫酸、高氯酸、过氧乙酸、氢溴酸、高氯酸中的一种或两种以上的混合物;

[0012] (3) 将步骤(1)获得的1000-2000份的海带加入到步骤(2)的酸性溶液中,得混合物A;

[0013] (4) 称取1-25份复合酸性酶、溶于300-600份水中,混合均匀后加入步骤(3)所得的混合物A中,混合均匀,得混合物B;

[0014] 所述复合酸性酶选自酸性 α -淀粉酶、酸性 β -淀粉酶、酸性纤维素酶、酸性半纤维素酶、酸性木聚糖酶、酸性羧酸酯酶、酸性糊精水解酶、酸性几丁质酶、酸性壳聚糖酶、酸性果胶酶、酸性脂肪酶、酸性胃蛋白酶、酸性胰蛋白酶、酸性木瓜蛋白酶、酸性弹性蛋白酶、酸性核酸外切酶、酸性核酸内切酶中的两种或两种以上的混合物;优选的,所述复合酸性酶为酸性木聚糖酶、酸性脂肪酶、酸性胃蛋白酶和酸性核酸外切酶的混合物;其质量配比为3:2:2:1。

[0015] (5) 将混合物B在温度为40-60℃条件下,搅拌15-90min;优选的温度为45-55℃;

[0016] (6) 将1-80份无机碱性化合物、1-20份复合碱性酶溶于1000-2000份水中,混匀后加入混合物B中,得混合物C;

[0017] 所述无机碱性化合物选自氢氧化钾、氢氧化钠、硝酸钾、硝酸钠、醋酸钠、醋酸钾、碳酸钾、碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸镁、硫酸钠、硫酸镁中的一种或两种以上的混合物;

[0018] 所述复合碱性酶选自碱性 α -淀粉酶、碱性 β -淀粉酶、碱性纤维素酶、碱性半纤维素酶、碱性木聚糖酶、碱性羧酸酯酶、糊精水解酶、碱性几丁质酶、碱性壳聚糖酶、碱性果胶酶、碱性脂肪酶、碱性磷酸酶、碱性胃蛋白酶、碱性胰蛋白酶、碱性木瓜蛋白酶、碱性弹性蛋白酶、碱性核酸外切酶、碱性核酸内切酶中的两种或两种以上的混合物。优选的,所述复合碱性酶为 α -淀粉酶、木聚糖酶、胰蛋白酶和核酸外切酶的混合物;其质量比为3:2:1:1;

[0019] (7) 将混合物C在温度为40-60℃条件下搅拌15-90min;优选的,温度为45-55℃;

[0020] (8) 将1-100份保藏剂溶于100份的水中,加入混合物C中,40-60℃条件下,搅拌均匀,冷却至室温,即得海藻中间体;

[0021] 所述的保藏剂选自硫酸铜、硫酸铁、硫酸亚铁、EDTA、EDDHA、ATMP、三聚磷酸钠、柠檬酸钠、酒石酸钾钠、苯甲酸钠、苯甲酸钾、山梨酸钾、山梨酸钠、丙酸钙、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、双乙酸钠、乳酸链球菌素中的一种或两种以上的混合物;优选的,所述保藏剂为苯甲酸钠、硫酸铜、EDTA和乳酸链球菌素按质量比为4:3:3:1的混合物。

[0022] 本发明中所述的份是指重量份数。

[0023] 通过本发明制备的海藻中间体以及海藻中间体在作为或制备肥料方面的应用也

属于本发明保护的范畴。

[0024] 本发明具有以下优点：

[0025] (1) 本发明制备方法高效、快速。酶提取可以选择性的快速分解相应底物，具有快速、高效的特点。与传统酸碱提取工艺相比，本发明提取效率提高了50%以上，海藻多糖含量提高50-100%，海藻酸含量在3.5-4.0%之间，海藻中间体产品效果显著提升。

[0026] (2) 通过本发明制备的海藻中间体温温和、全面。农用海藻中间体提取技术是伴随海藻肥在我国市场份额扩大及消费者认同度普遍提高的前提下逐步开发，其本源大多是借鉴工业海藻酸钠生产工艺衍生而来，因此传统工艺过分追求海藻酸钠含量，而忽视了其他有效成分。研究发现，海藻肥效机制并非单一的由海藻酸所决定，而是由海藻中所含的多种海洋功能性碳水化合物、氨基酸多肽以及内源激素类活性小分子物质共同协作实现，而这些功能分子在传统工艺中几乎被高温、酸碱破坏殆尽，导致产品肥效大打折扣；另外，不同领域对同一产品的指标要求及应用方式存在巨大差别，海藻中间体应用于肥料生产时，除喷灌及滴灌肥要求产品全溶之外，其他肥种对产品溶解度要求不是非常严格。海藻提取过程中产生的部分非水溶性碳水化合物及脂类(如纤维素类、脂蛋白类)本身即为非常优良的海洋有机质成分，能够对作物生长起到一定的辅助作用，如在提取过程中将这类成分丢弃既会造成生产的污染排放、又会使最终产品肥效大打折扣。本发明在快速、高效的前提下，整个过程均在海藻稳定pH及温度条件下进行，真正实现了“无损提取”，将海藻中所有有效成分全部保留在产品中，真正实现全效添加。

[0027] (3) 通过本发明制备的海藻中间体安全，无害。由于在提取过程中不添加任何有毒有害物质，保证了本发明所生产产品无残留、无公害。另外，海藻提取过程中产生的部分非水溶性碳水化合物及脂类(如纤维素类、脂蛋白类)本身即为非常优良的海洋有机质成分，能够对作物生长起到一定的辅助作用，如在提取过程中将这类成分丢弃既会造成生产的污染排放、又会使最终产品肥效大打折扣。因此，本发明对产品进行了全回收，不会造成任何污染排放。从而达到节肥增效、消除污染、保护环境的目的。

[0028] (4) 采用本发明所生产的海藻中间体作为海洋生物肥料可以根据不同的作物及土壤环境的改变，启动相应的应答机制，达到自动调节作物自身代谢调控途径、土壤理化性质及微生物菌群结构等作用；有效提高肥料利用率，减少化肥用量达5-10%；综合提高作物的抗寒、抗旱等抗逆能力，尤其对细菌、真菌病害有明显的预防和抑制效果，显著降低重茬、死棵现象发生率，有效吸附土壤重金属，调节土壤微生物菌群结构，消除土壤板结及酸化问题，实现作物持续高产。

附图说明

[0029] 图1为本发明方法提取海藻中间体HPLC测定结果；

[0030] 图2为通过碱法提供海藻中间体测定结果；

[0031] 图3为本发明海藻中间体中赤霉素HPLC测定结果；

[0032] 图4为本发明海藻中间体中脱落酸HPLC的测定结果；

[0033] 图5为本发明海藻中间体中吲哚丁酸HPLC的测定结果；

[0034] 图6为本发明海藻中间体重吲哚乙酸HPLC的测定结果；

[0035] 图7为本发明海藻中间体对西红柿和黄瓜的促生效果；

[0036] 图8为本发明对西红柿和黄瓜增加精品果实效果。

具体实施方式

[0037] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0038] 实施例1一种新型酶法提取海藻中间体的方法,包括以下步骤:

[0039] (1) 称取500份干海带,用水洗净后浸泡充分吸水至1500份;

[0040] (2) 称取100份水,向其中加入3份的磷酸,混匀,得磷酸溶液;

[0041] (3) 将步骤(1)获得的1500份的海带加入到步骤(2)的磷酸溶液中,获得混合物A;

[0042] (4) 称取10份复合酸性酶溶于500份水中,混合均匀后加入步骤(3)所得的混合物A中,混合均匀,得混合物B;

[0043] 所述复合酸性酶为酸性木聚糖酶、酸性脂肪酶、酸性胃蛋白酶和酸性核酸外切酶的混合物,其质量配比为3:2:2:1;

[0044] (5) 将混合物B在温度为40℃条件下,搅拌15-90min;

[0045] (6) 将65份氢氧化钾、15份复合碱性酶溶于1500份的水,混匀后加入混合物B中,得混合物C;

[0046] 所述复合碱性酶为碱性 α -淀粉酶、碱性木聚糖酶、碱性胰蛋白酶和碱性核酸外切酶的混合物,其质量配比为3:2:1:1;

[0047] (7) 将混合物C在温度为40℃条件下搅拌15-90min;

[0048] (8) 将20份保藏剂溶于100份的水中,然后加入搅拌后的混合物C中,50℃条件下,搅拌均匀,冷却至室温,即得海藻中间体;

[0049] 所述保藏剂为苯甲酸钠、硫酸铜、EDTA和乳酸链球菌素的混合物,其质量比例为4:3:3:1。

[0050] 实施例2一种新型酶法提取海藻中间体的方法,包括以下步骤:

[0051] (1) 称取150份干海带,用水洗净后浸泡充分吸水至1000份;

[0052] (2) 称取200份水,向其中加入3.5份的醋酸,混匀,得醋酸溶液;

[0053] (3) 将步骤(1)获得的1000份的海带加入到步骤(2)的醋酸溶液中,获得混合物A;

[0054] (4) 称取6份复合酸性酶溶于350份水中,混合均匀后加入步骤(3)所得的混合物A中,混合均匀,得混合物B;

[0055] 所述复合酸性酶为酸性壳聚糖酶、酸性木聚糖酶、酸性脂肪酶、酸性胃蛋白酶和核酸外切酶的混合物,其质量配比为3:3:2:1:1;

[0056] (5) 将混合物B在温度为40℃条件下,搅拌20min;

[0057] (6) 将10份无机碱性化合物、3份复合碱性酶溶于1000份的水,混匀后加入混合物B中,得混合物C;

[0058] 所述无机碱性化合物为硫酸镁;

[0059] 所述复合碱性酶为碱性 α -淀粉酶、碱性几丁质酶、碱性脂肪酶、胃蛋白酶和碱性磷酸酶的混合物,其质量配比为2:2:2:1:1;

- [0060] (8) 将混合物C在温度为40℃条件下搅拌18min;
- [0061] (9) 将70份保藏剂溶于100份的水中,加入搅拌后的混合物C中,45℃条件下,搅拌均匀,冷却至室温,即得海藻中间体;
- [0062] 所述的保藏剂为酒石酸钾钠、硫酸铜、EDTA和苯甲酸钠,按质量比6:3:3:1的混合物。
- [0063] 实施例3一种新型酶法提取海藻中间体的方法,包括以下步骤:
- [0064] (1) 称取400份干海带,用水洗净后浸泡充分吸水至2000份;
- [0065] (2) 称取480份水,向其中加入1.5份的硫酸,混匀,得硫酸溶液;
- [0066] (3) 将步骤(1)获得的2000份的海带加入到步骤(2)的硫酸溶液中,获得混合物A;
- [0067] (4) 称取13份复合酸性酶溶于580份水中,混合均匀后加入步骤(3)所得的混合物A中,混合均匀,得混合物B;
- [0068] 所述复合酸性酶为酸性羧酸酯酶、酸性糊精水解酶、酸性脂肪酶、弹性蛋白酶、几丁质酶和核酸外切酶的混合物,其质量配比为4:2:3:3:1:1;
- [0069] (5) 将混合物B在温度为55℃条件下,搅拌30min;
- [0070] (6) 将70份无机碱性化合物、18份复合碱性酶溶于1800份的水,混匀后加入混合物B中,得混合物C;
- [0071] 所述的无机碱性化合物为硝酸钾;
- [0072] 所述复合碱性酶为碱性磷酸酶、碱性脂肪酶、碱性木瓜蛋白酶、碱性磷酸酶的混合物,其质量配比为1:3:1:2;
- [0073] (7) 将混合物C在温度为58℃条件下搅拌30min;
- [0074] (8) 将50份保藏剂溶于100份的水中,加入搅拌后的混合物C中,58℃条件下,搅拌均匀,冷却至室温,即得海藻中间体;
- [0075] 所述的保藏剂为酒石酸钾钠、硫酸亚铁、ATMP、对羟基苯甲酸甲酯和双乙酸钠按质量比7:3:3:1:1的混合物。
- [0076] 试验例1通过本发明方法提取海藻中间体与碱法提取海藻中间体的结果比较
- [0077] 通过本发明方法提取海藻中间体HPLC测定结果如图1所示,通过碱法提供海藻中间体测定结果如图2所示。
- [0078] 试验例2本发明海藻中间体中生长调节剂的测定
- [0079] 本发明海藻中间体中含有多种生产调节剂,因为这些生长调节剂的存在,海藻中间体作为肥料时肥效显著。
- [0080] 本发明海藻中间体中赤霉素HPLC测定结果如表1、图3所示。

[0081] 表1

[0082]

样品名称	保留时间	峰面积	峰高
赤霉素	42.477	671849670	3655765

[0083] 本发明海藻中间体中脱落酸HPLC的测定结果如表2、图4所示。

[0084] 表2

[0085]

样品名称	保留时间	峰面积	峰高
------	------	-----	----

脱落酸	14.153	99253	42257
-----	--------	-------	-------

[0086] 本发明海藻中间体中吡啶丁酸HPLC的测定结果如表3、图5所示。

[0087] 表3

[0088]

样品名称	保留时间	峰面积	峰高
吡啶丁酸	22.149	19030478	223351

[0089] 本发明海藻中间体重吡啶乙酸HPLC的测定结果如表4、图6所示。

[0090] 表4

[0091]

样品名称	保留时间	峰面积	峰高
吡啶乙酸	27.371	82188639	1359312

[0092] 试验例2本发明中间体对植物生长、果实成熟等方面的影响。

[0093] 本发明中间体可以有效促进植株对大量、中微量元素的吸收,促进根系生长,加速植株代谢,提高植株对养分的利用率。将本发明制备的海藻中间体添加到冲施肥中,然后施用到农田,海藻中间体添加剂量为每亩地200-450ml。

[0094] 本发明海藻中间体对西红柿和黄瓜的促生效果如图7所示;本发明对西红柿和黄瓜增加精品果实效果如8所示。

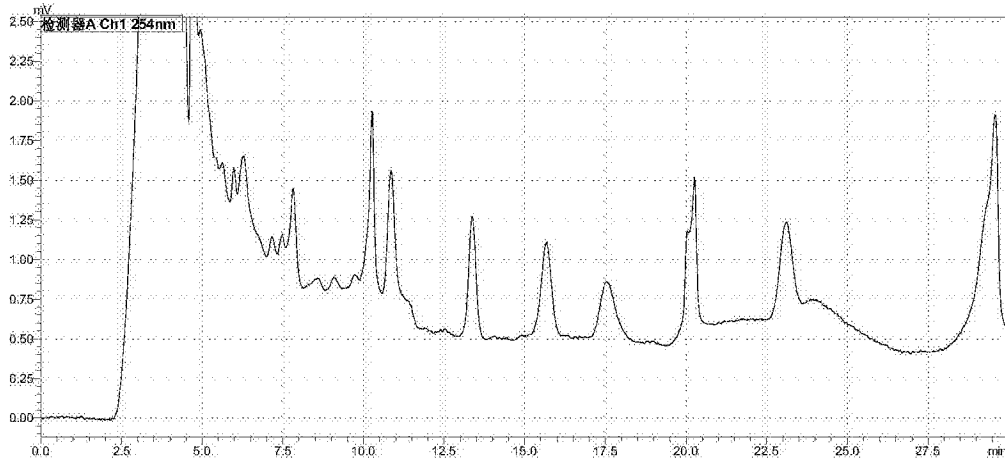


图1

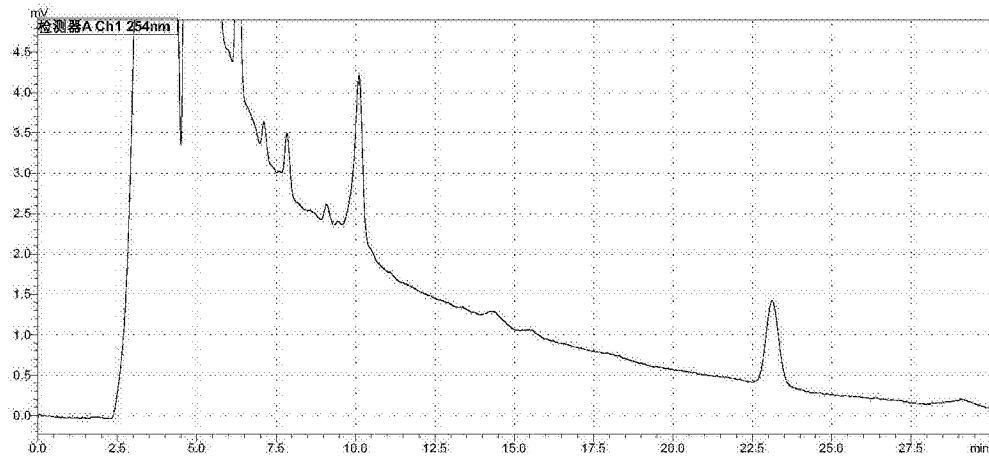


图2

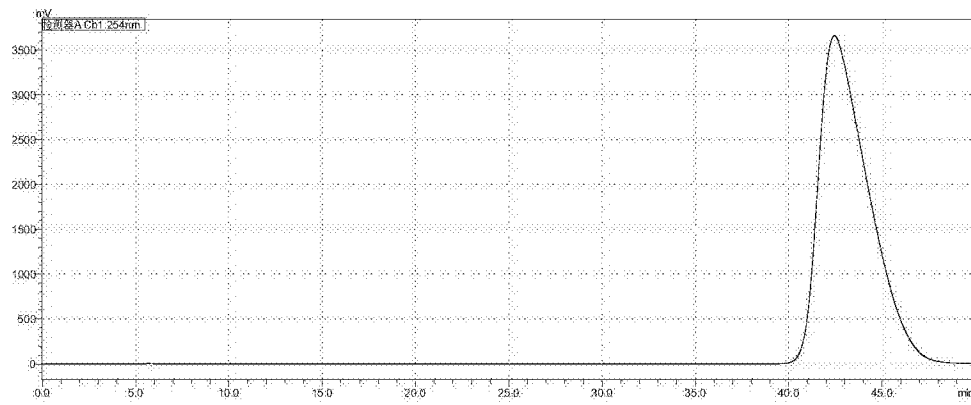


图3

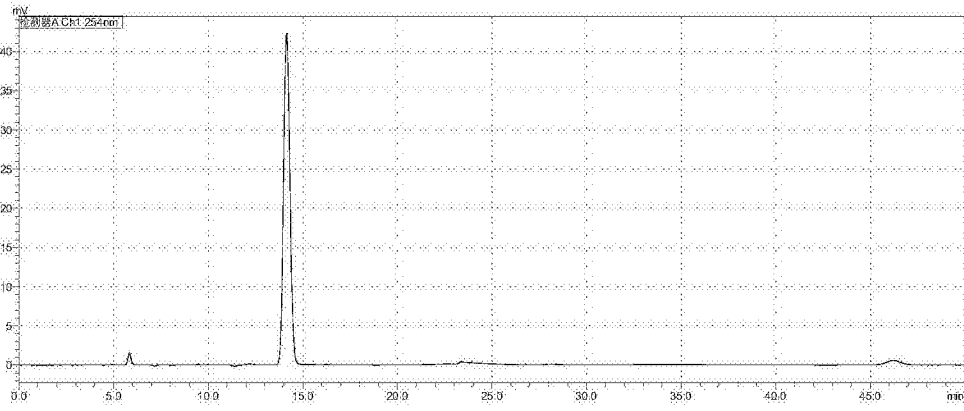


图4

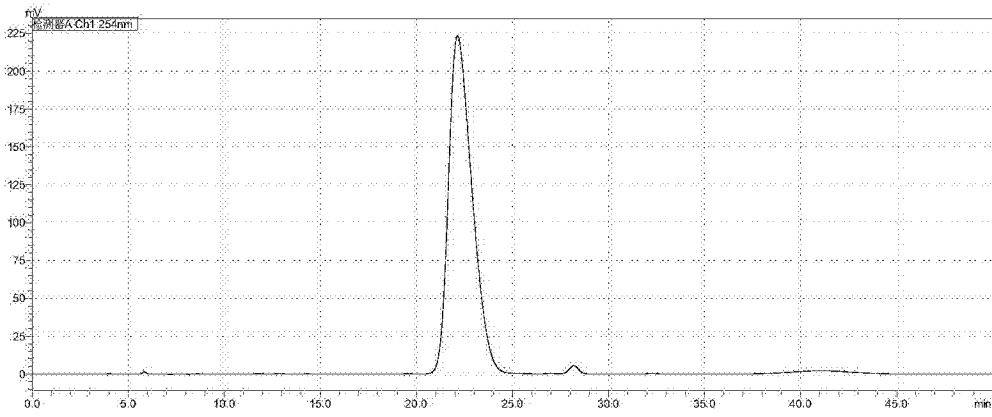


图5

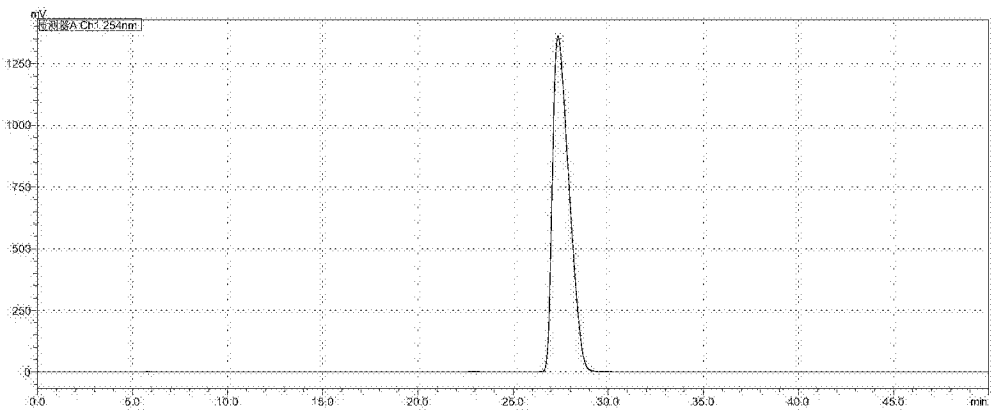


图6

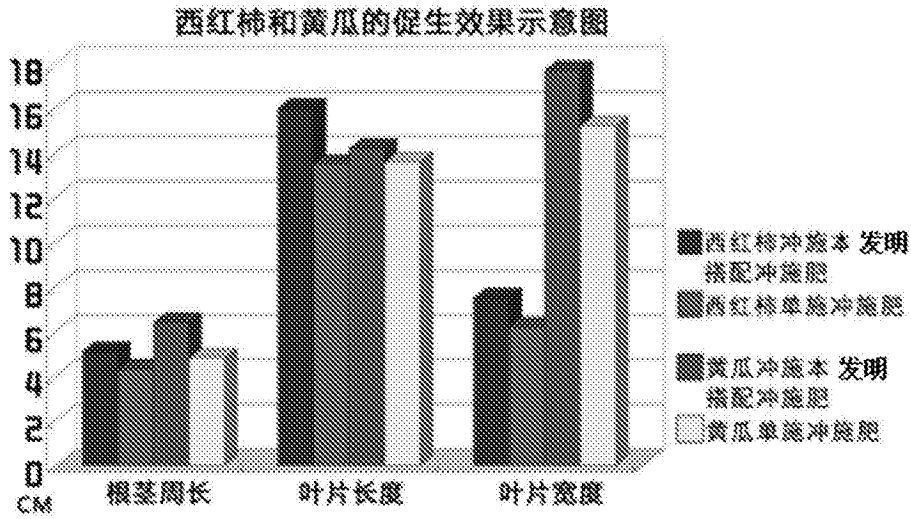


图7

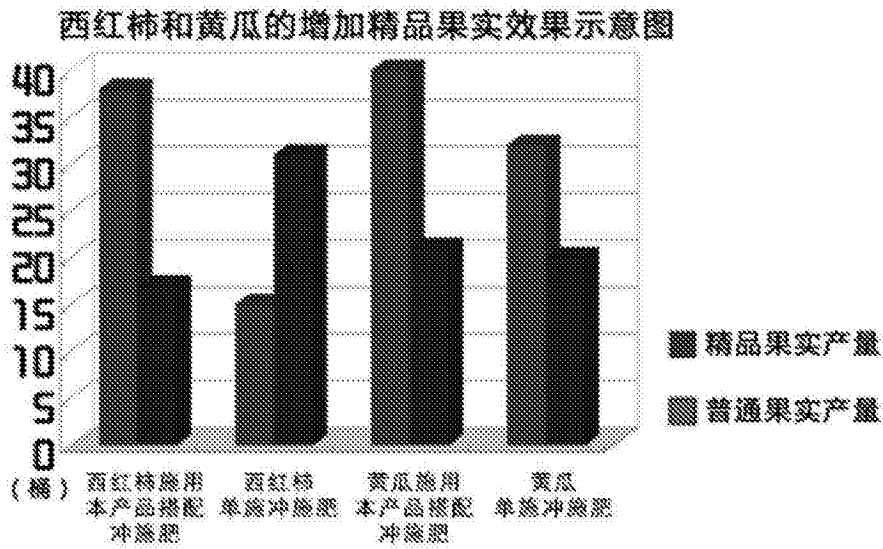


图8