

# 石蒜总生物碱的提取及其对酒精发酵过程的抑制机理

杨 馨, 张 梁, 丁重阳, 石贵阳 \*

(工业生物技术教育部重点实验室, 江南大学生物工程学院生物资源与生物能源研究中心, 江苏 无锡 214122)

**摘 要:** 基于对石蒜生物碱抑菌作用的研究, 结合生物碱的药用价值, 提出酒精发酵前提取生物碱的必要性。通过单因素试验探讨生物碱的提取方式和提取条件对生物碱提取率的影响, 结果表明, 提取剂为甲醇、料醇比 1:15 (g/mL)、提取温度 60℃、提取时间 1h、提取液 pH11.0 条件下, 生物碱的提取量达 28.70mg/g; 进一步对含有生物碱和不含生物碱的两种石蒜原料进行酒精发酵过程比较, 结果显示, 石蒜生物碱对糖化酶活性和工业酒精酵母的生长均具有明显抑制作用, 对  $\alpha$ -淀粉酶则影响较小, 初步揭示了石蒜生物碱对酒精发酵过程的抑制机理。

**关键词:** 石蒜; 生物碱提取; 酒精发酵; 抑制机理

## Extraction of Total Alkaloids from *Lycoris radiata* Bulbs and Its Inhibitory Effect and Mechanism against Alcohol Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*

YANG Xin, ZHANG Liang, DING Zhong-yang, SHI Gui-yang\*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Center for Bioresources and Bioenergy, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** The anti-*Saccharomyces cerevisiae* effect and notable medicinal value of *Lycoris radiata* alkaloids highlight the importance and necessity of total alkaloids extraction before ethanol fermentation from *L. radiata* bulbs. In the present study, one-factor-at-a-time experiments were conducted to explore the extraction efficiency of total alkaloids from *L. radiata* bulbs with respect to five operating parameters including extraction solvent type, temperature, extraction time, solid-to-liquid ratio and pH. The results showed that the extraction efficiency of total alkaloids was up to 28.70 mg/g under the following conditions: methanol as extraction solvent, solid-to-liquid ratio of 1:15 (g/mL), temperature of 60 °C, pH 11.0 and extraction time of 1 h. Further, the fermentation performance of *L. radiata* bulbs for producing ethanol was compared before and after the removal of total alkaloids. As a result, the presence of total alkaloids had dramatic inhibitory effect on glucoamylase activity and the growth of *S. cerevisiae* and little effect on  $\alpha$ -amylase activity. This can preliminarily explain the inhibitory mechanism of *Lycoris radiata* alkaloids on ethanol fermentation.

**Key words:** *Lycoris radiata*; alkaloids extraction; ethanol fermentation; inhibitory mechanism

中图分类号: Q815

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)12-0083-05

随着社会的发展,我国能源消费量的不断增长与石油储量的相对不足(仅占世界储量的2%)的矛盾将会成为长期制约我国经济发展和社会进步的障碍之一。燃料乙醇是国际上近年来被公认为有望缓解能源问题的可再生清洁能源。然而,传统的粮食原料生产工艺越来越受到限制,因此,发展非粮原料特别是纤维质原料燃料乙醇清洁生产工艺是趋势。但由于纤维质原料生产乙醇

依然存在诸多技术瓶颈,短期内无法形成产业化,因而,发展木薯、甜高粱等非粮原料生产乙醇是当前重点。

石蒜<sup>[1]</sup>(*Lycoris radiata*, Herb)属石蒜科(Amaryllidaceae)石蒜属(*Lycoris* Herb),是一类生长繁殖迅速、易于人工栽培且富含药用生物碱、多糖等活性物质的非粮淀粉质资源。其来源广,易于在山坡、沙地等贫瘠土地上种植且无需管理,秉承了“因地制宜、非粮为主”、

收稿日期: 2010-09-01

基金项目: 2008 年度江苏省“青蓝工程”科技创新团队资助项目

作者简介: 杨馨(1984—),女,硕士研究生,研究方向为发酵工程。E-mail: snrtfjmj@gmail.com

\* 通信作者: 石贵阳(1963—),男,教授,研究方向为酶技术与工程、再生资源生物转化和生理活性物质的微生物细胞转化技术。E-mail: gyshi@jiangnan.edu.cn

“不与人争粮、争地”的原则。据测定<sup>[2]</sup>，石蒜鳞茎含有40%以上的淀粉，其中石蒜的一个品种“忽地笑”的鳞茎淀粉含量最高，可达59.7%，非常适合乙醇生产。

由于生物碱是一种高附加值的药理活性产品，其具有中枢神经系统和心血管系统作用及抗癌、抗菌作用等，石蒜属植物含有的石蒜碱、加兰他敏、力可拉敏等十余种生物碱，可用于治疗食物中毒、淋巴结核、风湿性关节炎等；提取的加兰他敏和力可拉敏，是治疗小儿麻痹后遗症的特效药<sup>[3]</sup>。目前，国内外对石蒜的研究主要集中在种属间亲缘关系的揭示<sup>[4-5]</sup>和其中生物碱的提取合成<sup>[6]</sup>、结构鉴定<sup>[7]</sup>及生理活性<sup>[8]</sup>等方面，而对占鳞茎干质量主要成分的淀粉则作为副产物遗弃，造成资源浪费和环境污染。

本课题组前期初步研究显示，石蒜所含的生物碱对酒精发酵具有抑制作用。本实验以期在乙醇发酵工段前快速、简便而有效的提取生物碱，同时尽可能减少淀粉质随副产物流失，达到既解除乙醇发酵抑制作用，又综合利用石蒜原料的双重效果，提高石蒜深加工的附加值，增加农民收入，丰富燃料乙醇生产原料来源。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

工业酒精酵母(*Saccharomyces cerevisiae* CICIMY0086)由本实验室保藏；采用YEPD培养基培养菌种。

新鲜石蒜鳞茎 贵州芊芊园艺新技术发展有限公司；中温 $\alpha$ -淀粉酶(2000U/mL)、糖化酶( $1.4 \times 10^5$ U/mL)无锡赛德生物工程有限公司；生物总碱标准品 西安华萃生物技术有限公司；甲醇、乙醇、乙酸乙酯、浓氨水等均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

DKY-II型恒温调速回转式摇床 上海欣蕊自动化设备有限公司；4K15型台式高速冷冻离心机 美国Sigma公司；UV3000紫外分光光度计 日本日立公司；SevenMulti型pH/电导率/离子综合测试仪 上海梅特勒-托利多仪器有限公司；旋转蒸发器 无锡市星海王生化设备有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 种子培养

将种子接入摇瓶活化24h后，转接入种子培养基，30℃、150r/min，培养12h。

#### 1.3.2 酒精发酵实验

未提取过生物碱的原料(淀粉含量为50.16%)采用料水比1:4(g/mL)、提取过生物碱的原料(淀粉含量为35.86%)采用料水比1:3(g/mL)，其他条件保持一致进行液化、糖化及酒精发酵。

#### 1.3.3 生物碱检测波长的确定

分别以甲醇、石蒜总碱标准品的甲醇溶液和生物碱提取物的甲醇溶液在波长200~400nm之间进行扫描，得紫外吸收图谱，以最大吸收峰处的波长为检测波长。

#### 1.3.4 标准曲线的绘制与样品的测定

以甲醇配制1mg/mL石蒜总生物碱标准溶液；分别吸取该标准液0.2~1.8mL至10mL比色管，甲醇定容后分别在289nm以纯甲醇为空白比色，记录各吸光度。以生物总碱质量浓度(mg/mL)为横坐标，以吸光度为纵坐标作标准曲线(略)，得回归方程为 $y = 4.41x + 0.035$ ， $R^2 = 0.997$ 。

生物总碱提取液真空浓缩至干并以甲醇溶解后，取1mL稀释至适当倍数的该样品，按上述操作测定吸光度，根据标准曲线计算生物总碱含量。

#### 1.3.5 生物碱的提取

新鲜石蒜鳞茎经压磨、烘干、粉碎后过30目筛，称取该粉末0.5g与提取剂以1:10(g/mL)固液比混合，加入1mL浓氨水调节pH值至碱性(pH11.5~12)，55℃水浴1h，冷却至室温后过滤，滤液以1.3.4节方法测定生物总碱含量；滤渣经酸水解后测定总糖。以总生物碱的提取量和淀粉保留率为指标确定最佳提取工艺。淀粉保留率以总糖计。

$$\text{总生物碱的提取量} / (\text{mg/g}) = \frac{\text{提取液中生物碱质量}}{\text{原料质量}}$$

$$\text{总糖含量} / \% = \frac{\text{提取后残渣中的总糖}}{\text{原料质量}}$$

#### 1.3.6 生物碱沉淀实验<sup>[9]</sup>

将粗生物碱精制后用0.5mol/L盐酸溶解，分别用生物碱沉淀试剂进行实验。

#### 1.3.7 滤纸片法测定石蒜生物碱对发酵用酵母的抑菌作用

菌悬液的制备：酵母培养至对数生长期，无菌生理盐水稀释至活细胞数为 $10^6 \sim 10^7$ 个/mL。

抑菌圈直径：将直径为6mm，灭菌后的滤纸片分别浸入5mg/mL生物碱溶液和5mg/mL苯甲酸钠溶液中过夜，菌悬液涂布平板后将纸片贴在平板上，30℃培养24h，测抑菌圈直径。

#### 1.3.8 酶活的测定

将石蒜生物总碱标准品溶解于2%淀粉溶液中配制不同浓度的淀粉溶液，并将此溶液用于 $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶酶活的测定。

#### 1.3.9 平板菌落计数法测定石蒜生物碱最低抑菌质量浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)<sup>[10]</sup>

配制不同质量浓度的生物碱溶液，分别加入培养基中，测定石蒜生物碱对酵母的最小抑菌质量浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 石蒜生物碱抑菌作用初探

由前期课题组初步研究得知石蒜原料直接用于酒精发酵,酒精产量实际值远低于理论值,残糖多,糖耗不完全,因此,有必要对可能影响发酵过程的生物碱作进一步研究,并根据石蒜的特性选择合适的提取方法。

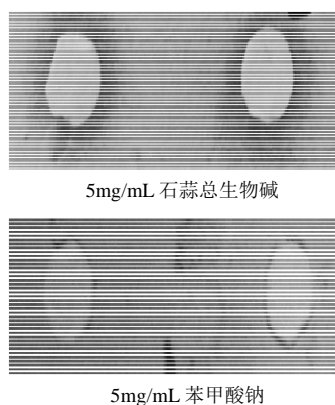


图1 生物碱抑菌实验

Fig.1 Inhibitory effect of *Lycoris radiata* alkaloids against *Saccharomyces cerevisiae* in comparison with that of sodium benzoate

采用滤纸片法测定石蒜生物碱对酵母的抑菌作用,从图1可以看出浸过生物碱的滤纸片所得的抑菌圈直径大约在10mm左右,说明生物碱的存在对酵母的生长代谢具有抑制作用,且抑菌作用比同浓度的苯甲酸钠强。

### 2.2 新鲜石蒜鳞茎中总生物碱的提取

由紫外吸收光谱可知,两种样品溶液在289nm±2nm处均呈现最高峰,且甲醇在此波长处无吸收峰,故选用289nm为生物总碱检测波长。

#### 2.2.1 提取剂的选择

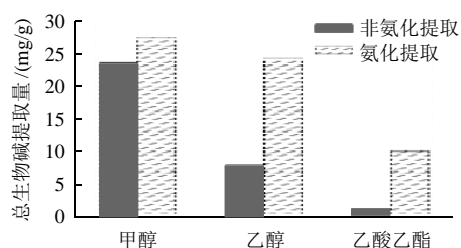


图2 不同提取剂对生物碱提取量的影响

Fig.2 Effect of solvent type on extraction efficiency of total alkaloids

选择甲醇、乙醇、乙酸乙酯作为提取剂;并以浓氨水调节pH值,对比非氨化和氨化条件下各提取剂的提取效果,结果如图2所示。生物碱的提取量和提取剂的极性相关,极性越大提取量越高,故在甲醇中的提取量最高;经氨化处理后生物碱的提取量均有增加,增幅程度与非氨化条件下的提取量呈反比。本实验选择甲

醇作为生物碱提取剂氨化提取。

#### 2.2.2 总生物碱提取条件的单因素试验

##### 2.2.2.1 固液比对提取的影响

将原料与甲醇混合,改变固液比进行研究。从图3可以看出,总生物碱提取量随流体量的增大呈现先增加后降低的趋势,并在1:15(g/mL)固液比时提取量达到最值。

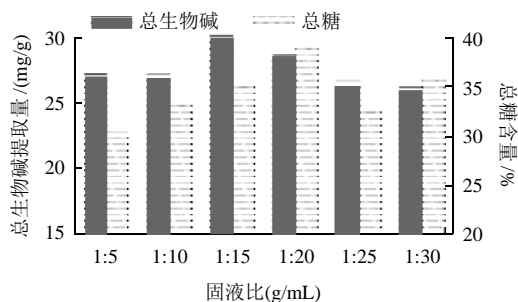


图3 固液比对总生物碱提取量和总糖的影响

Fig.3 Effect of solid-to-liquid ratio on extraction efficiency of total alkaloids

##### 2.2.2.2 温度对提取的影响

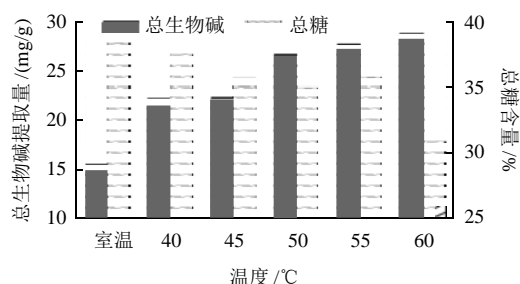


图4 温度对总生物碱提取量和总糖的影响

Fig.4 Effect of temperature on extraction efficiency of total alkaloids

由于甲醇的沸点在64.5℃,为防止提取剂挥发,提取温度应小于64.5℃,将原料与甲醇混合,改变温度进行研究。从图4可以看出,温度对总生物碱的提取量影响较大,提高温度有利于生物碱从石蒜中提取出来,当温度达到50℃以上时,提取量增加明显。

##### 2.2.2.3 提取时间对提取的影响

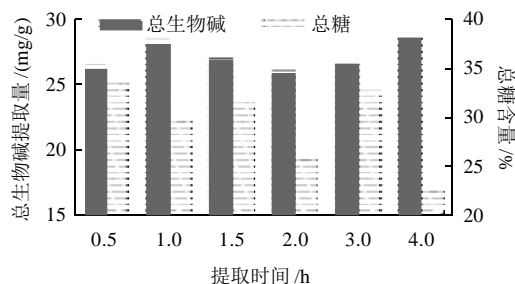


图5 提取时间对总生物碱提取量和总糖的影响

Fig.5 Effect of time on extraction efficiency of total alkaloids

将原料与甲醇混合,改变提取时间进行研究。从图5可以看出提取时间对总生物碱的提取影响不大,但时间过长可能使生物碱分子结构破坏,性质改变,且淀粉损失严重,另外出于对效率和成本的要求,短时间提取较为合理。

#### 2.2.2.4 氨化程度对提取的影响

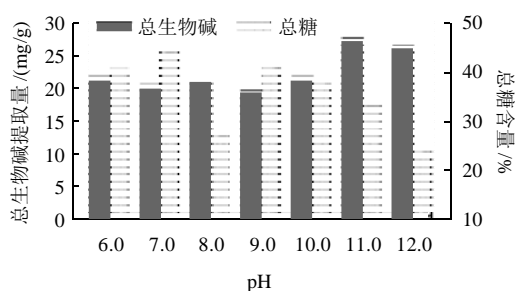


图6 氨化程度对总生物碱提取量和总糖的影响

Fig.6 Effect of pH on extraction efficiency of total alkaloids

将原料与甲醇混合,改变氨化程度进行研究。图6结果表明在pH10.0以下,提取量较为平稳,当pH值达到11.0以上时,提取量迅速上升,证明在强碱环境有利于生物碱的提取。

#### 2.2.2.5 最佳提取条件的验证

由以上结果确定针对生物碱提取量的最佳条件为固液比1:15(g/mL)、提取温度60℃、提取时间1h、提取液pH11.0,并在此条件下进行验证实验,结果见表1。

表1 验证实验结果

Table 1 Results of verification experiments under optimized extraction conditions

实验次数	总生物碱提取量/(mg/g)	提取后残渣总糖含量/%
1	27.89	36.86
2	29.54	38.38
3	28.68	37.87
平均值	28.70	37.70

由表1可知,在此条件下进行生物碱的提取,提取量较单因素条件的提取率高,淀粉损失也是最小的,故选择此条件进行提取是合理可行的。

#### 2.2.3 生物碱的验证

表2 生物碱沉淀反应结果

Table 2 Results of precipitation reaction for identification of total alkaloids

试剂名称	检测环境	现象	结果
碘化铋钾	酸性	橘红色絮状沉淀	阳性
碘-碘化钾	酸性	棕色→蓝紫色沉淀	阳性
水饱和苦味酸	中性	黄色针状沉淀	阳性

生物碱粗提液含有的如蛋白质、鞣质、胺类等杂质也能和沉淀试剂反应,因此,必须将生物碱精制后再进行实验,通常选用3种以上的生物碱沉淀试剂进行实验,以确保真实性。实验证明所提取的物质确为生物碱。

#### 2.3 石蒜生物碱抑制酒精发酵的验证

表3 生物碱的存在对酒精发酵过程的影响

Table 3 Effect of the presence of total alkaloids on ethanol fermentation from *L. radiata* bulbs

发酵过程	含有生物碱的原料	不含生物碱的原料
初始总糖/%	11.15	9.96
液化过程		
还原糖/%	1.16	1.00
液化率/%	10.40	10.04
糖化过程		
还原糖/%	5.99	9.29
糖化率/%	53.72	93.27
0h 还原糖/g	5.99	7.43
70h 还原糖/g	4.94	0.45
糖耗/g	1.05	6.98
酒精质量浓度/(g/L)	5.45	30.72

由表3可知,生物碱的存在对酒精发酵过程的液化过程影响不大,但对糖化过程的影响十分大,两者的糖化率分别为53.72%和93.27%;生物碱的存在对发酵过程也有影响,有生物碱存在的发酵过程,在整个70h的发酵时间内只利用了1/5的还原糖,没有生物碱存在的发酵过程,还原糖几乎耗尽。从淀粉的转化率来看,生物碱还没有影响到酵母的酒精代谢途径,耗糖量的大幅减少及有可能是参与代谢的酵母数量减少,使酒精发酵不能顺利进行。

#### 2.4 石蒜生物碱的抑制机理研究

##### 2.4.1 生物碱对中温 $\alpha$ -淀粉酶活性的影响

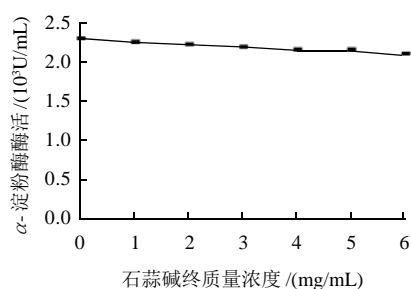


图7 不同生物碱质量浓度对应淀粉酶活

Fig.7 Plot of  $\alpha$ -amylase activity against *Lycoris radiata* alkaloid concentration

由图7可知,生物碱对液化酶的活性虽具有一定的影响,但效果并不明显,生物碱的存在并不足以影响液化的效果,这一点从2.3节可以得到印证。

##### 2.4.2 生物碱对糖化酶活性的影响

由图8可知,生物碱的存在对糖化酶的活性影响较大,酶活随着添加量的增加而逐渐降低。当添加量达

到5mg/mL和6mg/mL时,酶活只有原始酶活的55%和48%,从而间接影响醪液最终葡萄糖终浓度,这一点从2.3节也可以得到印证。

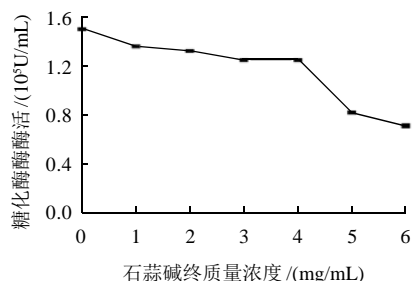


图8 不同生物碱质量浓度对应糖化酶酶活

Fig.8 Plot of glucoamylase activity against *Lycoris radiata* alkaloid concentration

#### 2.4.3 平板菌落计数法测定石蒜生物碱最低抑菌质量浓度

表4 石蒜生物碱的MIC测定

Table 4 Determination of the minimum inhibitory concentration of *Lycoris radiata* alkaloids against *Saccharomyces cerevisiae* strain CICIMY0086

供试菌	培养基中石蒜生物碱的终质量浓度/(μg/mL)						
	311	155	78	39	19	10	5
CICIMY0086	—	—	+	++	++	+++	+++

注:“—”表示无菌生长;“+”表示有少量菌生长;“+++”表示有大量菌生长。

如表4所示,当石蒜生物碱的质量浓度达到155 μg/mL时,就可抑制酵母的生长代谢活动而直接导致酵母数量锐减,使酒精产量降低。

通过对石蒜生物碱的抑制机理研究表明,石蒜生物碱对酒精发酵过程的抑制作用主要表现在对糖化酶活和工业酒精酵母生长的抑制。通过生物碱提取实验可知,石蒜总生物碱含量约为28.70mg/g,因此其在发酵液中的质量浓度达5.74mg/mL,这一质量浓度足以抑制整个发酵过程的顺利进行。

### 3 讨论

石蒜虽为理想的燃料酒精原料,但鳞茎中的生物碱却是制约其用于酒精发酵的主要因素。蒋红云等<sup>[11]</sup>研究表明石蒜生物碱混合物对萝卜、黄瓜、番茄和油菜种子萌发及幼苗的生长均具有较强的抑制作用;Strahi等<sup>[12]</sup>的研究表明从石蒜中提取的加兰他敏烷基化后是乙酰胆碱酯酶的有效抑制剂;由文献<sup>[13]</sup>可知,石蒜碱能抑制三羧酸循环中的脱氢酶活性,尤其是那些需要DPN或TPN的酶。这都充分显示,石蒜生物碱在菌体生长和酶活方面的抑制作用,所以在发酵前对生物碱进行提取是十分必要的。

本实验在初步探究生物碱的抑菌性后,为保证酒精发酵顺利进行,将生物碱的提取和酒精发酵有机结合,改进现有提取方法<sup>[14-15]</sup>,针对石蒜原料的特点和提取目

的,采用有机溶剂以减少淀粉损失;采用低温短时工艺在保持生物碱的活性的同时也减少淀粉的损失;采用浓氨水氨化处理,使生物碱处于游离状态,促进其在溶剂中的溶解,以便获得较高的提取率。在此种方式的处理下,不仅有助于降低提取后废渣对环境造成的污染,还可增加经济收益,进一步缩减对该属植物的开发成本的同时,实现对石蒜属植物的综合利用。

本实验进一步对两种原料发酵过程进行监测,提出生物碱的抑制机理,并进行论证。结果表明,生物碱的抑制机理体现在对糖化酶活和酵母生长的抑制,当生物碱质量浓度分别达到4mg/mL和155 μg/mL时就有导致糖化酶严重失活和抑制工业酒精酵母的生长繁殖的效果。实验中未提取生物碱的醪液总生物碱质量浓度为5.74mg/mL,足以抑制发酵过程;提取过生物碱的醪液总生物碱质量浓度仅为0.09mg/mL,该质量浓度对发酵过程已无影响,论证结果与发酵过程的监测结果完全吻合。

综合以上研究结果,在优化所得提取条件下,石蒜总生物碱的提取量为28.70mg/g,酒精产量为30.72g/L。但由于石蒜生物碱种类繁多,究竟是哪一种生物碱具有此抑制机理或者还有无其他的生理活性功能、分子水平上的作用机制如何,则有待于对总生物碱做进一步的分离纯化后获得单一纯品再进行深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 裴鉴,丁志遵.中国植物志[M].北京:科学出版社,1985,16(1):18.
- [2] 季春峰.石蒜属资源开发与应用[J].中国野生植物资源,2002,21(6):14.
- [3] 朱重胜,谢树祿.石蒜植物的种质资源、药用开发及其快速繁育[J].江西林业科技,2008(5):41-42.
- [4] LEE N-S, KIM M, LEE B S, et al. Isozyme evidence for the allotriploid origin of *Lycoris flavescens* (Amaryllidaceae)[J]. Plant Systematics and Evolution, 2001, 227(3/4): 227-234.
- [5] SHI Shuse, QIU Yingxiong, WU Ling, et al. Interspecific relationships of *Lycoris* (Amaryllidaceae) inferred from inter-simple sequence repeat data[J]. Scientia Horticulturae, 2006, 110(3): 285-291.
- [6] JORG E, TAKESHI T, YASUYUKI K, et al. Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloid galanthamine[J]. Phytochemistry, 1998, 49(4): 1037-1047.
- [7] ABDALLAH O-M. Minor Alkaloids from *Lycoris sanguinea*[J]. Phytochemistry, 1995, 39(2): 477-478.
- [8] TORIIZUKA Y, KINOSHITA E, KOGURE N, et al. New lycorine-type alkaloid from *Lycoris traubii* and evaluation of antitrypanosomal and antimalarial activities of Lycorine derivatives[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 16(24): 10182-10189.
- [9] 石广亮.白屈菜生物碱类成分提取、分离、纯化及体外抑菌作用研究[D].长春:吉林农业大学,2008:44-45.
- [10] 赵东亮,郁建平,周晓秋,等.博落回生物碱的抑菌作用研究[J].食品科学,2005,26(1):45-47.
- [11] 蒋红云,张燕宁,冯平章,等.石蒜对萝卜、黄瓜、番茄和油菜幼苗的化感效应[J].应用生态学报,2006,17(9):1655-1659.
- [12] BERKOV S, CODINA C, VILADOMAT F, et al. N-Alkylated galanthamine derivatives: potent acetylcholinesterase inhibitors from *Leucojum aestivum*[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 18(7): 2263-2266.
- [13] 中药大辞典[M].上海:上海科学技术出版社,1977:1210-1212.
- [14] 黄玉君,杨航,周玉,等.从石蒜属植物中提取石蒜碱的工艺方法:中国,1936013A[P].2007-03-28.
- [15] 吴彦,周守标,王安.石蒜中总生物碱提取条件研究[J].生物学报,2007,24(1):61-62.