

红酵母番茄红素提取工艺优化

王海兵, 吴晓英*, 刘世龙, 徐莹莹
(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510006)

摘要: 从破壁方法、浸提溶剂及提取条件等方面对黏红酵母番茄红素提取工艺进行优化研究。采用单因素试验对破壁方法及浸提溶剂进行选择, 结果表明热酸法是黏红酵母破壁提取番茄红素的最好方法, 丙酮-乙酸乙酯(1:1)混合液是理想的提取溶剂。采用正交试验方法对液料比、提取温度和提取时间等番茄红素提取条件进行优化, 得到适宜的提取条件为丙酮-乙酸乙酯(1:1)溶剂添加量 60mL/g、提取温度 30℃、提取时间 3h。在此提取工艺下, 得到红酵母番茄红素提取量为 4.55mg/g, 比未优化时的 3.22mg/g 增加了 41.30%。

关键词: 红酵母; 番茄红素; 提取工艺

Optimization of Extraction Process for Lycopene from *Rhodotorula glutins*

WANG Hai-bing, WU Xiao-ying*, LIU Shi-long, XU Ying-ying
(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Cell wall disruption followed by organic solvent extraction was used to extract lycopene from *Rhodotorula glutins*. The optimal cell wall disruption method and extraction solvent were found to be hot acid treatment and acetone-ethyl acetate (1:1), respectively. Three extraction conditions such as material-to-liquid ratio, temperature and time were optimized by orthogonal array design to be 1:60 (g/mL), 30 °C and 3 h, respectively. Under these conditions, the extraction rate of lycopene was 4.55 mg/g, 41.30% higher than before optimization.

Key words: *Rhodotorula*; lycopene; extraction process

中图分类号: TS264.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)16-0045-04

番茄红素(lycopene)是一种具有 11 个共轭双键的脂溶性不饱和碳氢化合物, 是类胡萝卜素的一种。在所有类胡萝卜素中, 番茄红素具有最强的消除单线氧功能, 其对单线氧的消除能力是 β -胡萝卜素的 2 倍, 抗氧化作用也明显优于 β -胡萝卜素, 同时还具有清除自由基、诱导细胞分化、减少 DNA 损伤等作用^[1-2], 在消除氧自由基、降低癌症发病率、增强人体免疫功能以及防治心脑血管疾病方面具有良好的应用前景^[3]。

目前, 番茄红素基本来源于植物和微生物, 提取方法主要有溶剂浸提法^[4]和超临界萃取法^[5]。溶剂浸提法操作简单, 超临界萃取法工艺复杂, 技术和设备要求高。本实验从一种能产番茄红素的红酵母菌体中提取番茄红素, 采用单因素试验的方法研究合适的破壁方法和浸提溶剂, 随后采用正交试验的方法, 研究在不同的提取温度、时间、液料比等条件下的提取效果, 最终确定最佳提取工艺。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 材料与试剂

黏红酵母 2.27 为本实验室筛选和保藏。

丙酮(分析纯) 天津市富宇精细化工有限公司; 盐酸(分析纯) 上海市中翔化学试剂有限公司; 石英砂(生化试剂) 天津市大茂化学试剂厂; 乙酸乙酯(分析纯) 天津市博迪化工有限公司; 石油醚(分析纯)、过氧化氢(分析纯)、双氧水(含体积分数 30% H_2O_2 的水溶液) 广州化学试剂厂; 浓缩酵母浸出膏(生化试剂) 浙江省富阳市杭富生物制品厂; 大豆蛋白胨(生化试剂) 广东环凯微生物科技有限公司; 蜗牛酶(生化试剂) 广州市齐云生物技术有限公司。

番茄红素标准品 上海融和医药公司; 烟碱(95%) 西安天则生物技术有限责任公司; 酮康唑 广州迪越化

收稿日期: 2010-10-15

基金项目: 华南理工大学国家大学生创新性实验计划项目(091056154)

作者简介: 王海兵(1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为生物制药。E-mail: 2004seaside@163.com

* 通信作者: 吴晓英(1961—), 女, 副教授, 硕士, 研究方向为生物制药和生物活性物质。E-mail: xywu@scut.edu.cn

工有限公司;青霉素 广州美津生物技术有限公司。

1.1.2 培养基

斜面活化培养基:葡萄糖 20g/L、蛋白胨 10g/L、酵母浸出粉 10g/L、琼脂 20g/L、自然 pH 值;液体种子培养基:葡萄糖 20g/L、蛋白胨 10g/L、酵母浸出粉 10g/L、自然 pH 值;液体发酵培养基:葡萄糖 50g/L、蛋白胨 15g/L、酵母粉 10g/L、初始 pH5、核黄素 0.5mg/L、吐温-80 体积分数 1.5%。

1.1.3 仪器与设备

SHP-450D 型生化培养箱 上海森信实验仪器有限公司;SKYB2112B 型恒温摇床 广州科桥实验技术设备有限公司;LD5-2A 型低速离心机 北京医用离心机厂;2802S 型紫外分光光度计 尤尼科(上海)仪器有限公司;1525 高效液相色谱仪、2487 紫外分光检测器 日本 Waters 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌体发酵液制备

黏红酵母 2.27 经菌种活化培养,再进行种子培养,然后以 5% 接种量接入发酵培养基中,在光照条件下,28℃,200r/min 振荡培养,分别在发酵的 24h 加入烟碱 2.5mL/L 和青霉素 4mg/L,36h 时添加双氧水 1.2mL/L,60h 时添加酮康唑 400mg/L,96h 后发酵结束^[6]。发酵液经 4000r/min 离心 10min 后,收集菌体,贮存于 4℃ 冰箱中备用。

1.2.2 红酵母番茄红素的提取方法

红酵母细胞的破壁方法:由于番茄红素为胞内色素,必须破壁之后才能提高色素的提取率。红酵母的细胞壁比较坚硬,用丙酮等有机溶剂对其破坏程度不高。实验中选用酸热水解法^[7]、研磨法、酶消化法、酶超声波破碎法 4 种便于实验室操作的酵母破壁方法^[8],其具体操作和破壁效果如下:

热酸破碎法:培养酵母,获取发酵液 10mL,装于 15mL 离心管中,4000r/min 离心 10min,水洗后得酵母泥,然后加入 3mol/L HCl 溶液 5mL 浸泡 1.5h,然后再分别沸水浴 6min,迅速冷却,4000r/min 离心 10min,得沉淀水洗 2 次,离心得到菌体残片;分别加入丙酮 9mL,混合均匀,浸提 1h,4000r/min 离心 10min,得到色素丙酮浸提液。

研磨法:取发酵液 10mL,装于 15mL 离心管中离心,水洗后得酵母泥。将其转入研钵中,加适量石英砂,充分研磨 0.5h,然后再将其转移到离心管中,离心,得菌体残片,再加入丙酮 9mL,混合均匀,浸提 1h,4000r/min 离心 10min,得到色素丙酮浸提液。

酶消化法:取 10mL 摇瓶发酵液,装于 15mL 离心管中,4000r/min 离心 10min,得沉淀,水洗一次,再

制成 10mL 菌悬液,按 45mg/g 酶量加入蜗牛消化酶,调节 pH4.5,放至摇床,在 37℃,分别处理 6h,然后离心得菌体残片,再加入丙酮 9mL,混合均匀,浸提 1h,4000r/min 离心 10min,得到色素丙酮浸提液。直接测量分光光度。

酶消化协同超声破碎法:取 10mL 摇瓶发酵液,装于 15mL 离心管中,4000r/min 离心 20min,得沉淀,水洗一次,再制成 10mL 菌悬液,按 45mg/g 酶量加入蜗牛消化酶,调节 pH4.5,放至摇床,37℃ 处理 6h。随后在菌液中伸入超声探头,将超声功率调至 100%,频率为开 5s、关 3s,处理 15min,离心得菌体残片,再加入丙酮 9mL,混合均匀,浸提 1h,4000r/min 离心 10min,得到色素丙酮浸提液。

1.2.3 不同溶剂提取比较

红酵母细胞破壁后,用正己烷、乙酸乙酯、石油醚以及混合溶剂代替丙酮,比较提取效果。

1.2.4 提取条件的优化

红酵母细胞破壁后,对液料比、提取时间、提取温度对色素提取的影响进行正交试验,确定最优组合,计算优组合理论产量。

1.2.5 番茄红素含量的测定

将色素提取液用 0.22μm 微孔滤膜过滤后,以高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定提取液中番茄红素的含量。同时配制不同质量浓度的标准品溶液,在相同条件下测定,根据峰面积制备标准曲线定量。

高效液相色谱条件:色谱柱为 C₁₈ 硅胶柱(250mm × 4.6mm, 5μm); Binary 高效泵,检测器为 Waters-2487, Double λ Absorbance Detector; 数据分析软件: Breeze; 流动相为乙腈-二氯甲烷=10:90(V/V); 检测波长 472nm; 流速 1.0mL/min; 柱温 28℃; 进样量 10μL。

2 结果与分析

2.1 番茄红素标准曲线

准确称量 2.5mg 的番茄红素标准品,用丙酮溶解,定容于 10mL 的棕色容量瓶中,质量浓度 250μg/mL。再分别稀释成 50、100、150、200、250μg/mL 质量浓度梯度,经 0.22μm 滤膜过滤后 HPLC 检测,数据处理,得到番茄红素标准曲线方程: $y=10.892x$, $R^2=0.9984$ 。

2.2 不同破壁方法对红酵母番茄红素提取效果的影响

由酸热水解法、研磨法、酶消化法、酶超声波破碎法 4 种破壁方法得到的色素初提液,用 HPLC 方法测定番茄红素的提取量,结果见表 1。

由表 1 可知,热酸法和研磨法的破壁效果比较好,酶消化法和酶-超声法效果较差,因此,本实验选用热

酸法来进行细胞破壁。由于番茄红素的长链共轭结构, 有很强的还原性^[9], 长时间在加热的酸性条件下会不太稳定, 会引起部分分解破坏, 使得提取量和纯度会有所降低, 所以继续探索更加温和、效率更高的细胞破壁方法是值得进一步研究的方向, 例如研磨法与酶法相耦合。

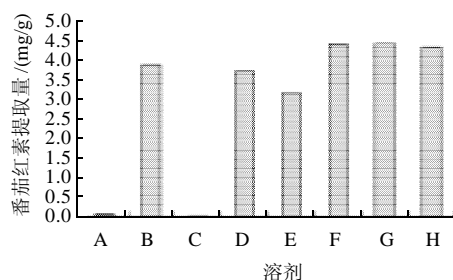
表1 不同破壁方法的破壁效果

Table 1 Effect of cell wall disruption methods on extraction rate of lycopene

破壁方法	热酸法	研磨法	酶消化法	酶-超声法
番茄红素提取量/(μg/g)	3.22	2.51	0.59	1.02

2.3 不同溶剂对红酵母番茄红素提取效果的影响

用热酸破壁后, 离心、水洗、离心后倒掉上清液, 得菌体残片, 在分别加入乙酸乙酯、正己烷、石油醚、丙酮等以及不同比例混合的溶剂进行浸提试验, 其中石油醚和正己烷得到的浸提液基本无色, 其余溶剂浸提得到的结果见图1。



A. 正己烷; B. 乙酸乙酯; C. 石油醚; D. 丙酮; E. 乙酸乙酯-丙酮(1:3); F. 乙酸乙酯-丙酮(1:2); G. 乙酸乙酯-丙酮(1:1); H. 乙酸乙酯-丙酮(2:1)。

图1 不同提取溶剂对番茄红素提取量的影响

Fig.1 Effect of different organic solvents on extraction rate of lycopene

由图1可知, 乙酸乙酯和丙酮是比较适合红酵母番茄红素的提取溶剂, 用不同比例的两种溶剂混合进行提取试验, 发现番茄红素提取量有一定程度的提高, 当以乙酸乙酯-丙酮(1:1)混合液作为溶剂提取时, 番茄红素提取量可达到最大值4.46mg/g, 因此本实验选用乙酸乙酯-丙酮(1:1)混合液作为浸提溶剂。

2.4 红酵母番茄红素提取工艺的优化

确定红酵母番茄红素提取的细胞破碎方法、浸提溶剂后, 对提取时间、提取温度、液料比3因素进行正交试验优化, 其因素水平及设计与结果见表2、3。

由表2、3可知, 各因素对番茄红素提取量的影响不尽相同。从极差来看, 提取条件对番茄红素提取量的影响大小为液料比>浸提时间>浸提温度。7号试验的番茄红素含量最大, 所以7号所对应的条件组合

$A_3B_1C_3$ 为最佳提取条件, 即浸提时间3h、提取温度30℃、液料比60:1。在该条件下, 番茄红素提取量可达到4.55mg/g, 比优化前的提取量3.22mg/g提高了41.3%。

表2 红酵母番茄红素提取工艺正交试验各因素及水平

Table 2 Factors and levels in orthogonal array design

因素	水平		
	1	2	3
A 提取时间/h	1	2	3
B 提取温度/℃	30	40	50
C 液料比(mL/g)	40:1	50:1	60:1

表3 红酵母番茄红素提取工艺正交试验设计方案及结果分析

Table 3 Orthogonal array design and corresponding experimental results

试验号	A	B	C	番茄红素提取量/(mg/g)
1	1	1	1	2.57
2	1	2	2	4.07
3	1	3	3	4.33
4	2	1	2	4.34
5	2	2	3	4.29
6	2	3	1	4.18
7	3	1	3	4.55
8	3	2	1	4.42
9	3	3	2	3.95
k_1	3.66	3.82	3.72	
k_2	4.27	4.26	4.12	$A_3B_1C_3$
k_3	4.31	4.15	4.39	$C > A > B$
R	0.65	0.44	0.67	

3 结论与讨论

本实验从破壁方法、浸提溶剂及提取条件等方面对黏红酵母番茄红素的提取进行研究, 结果表明: 热酸法破碎细胞壁效率最高, 用乙酸乙酯-丙酮(1:1)的混合溶剂提取效果最好, 在液料比60:1(mL/g)、提取温度30℃、浸提时间3h的条件下, 番茄红素提取量最大, 可达到4.55mg/g。

本实验是在实验室条件下, 对红酵母内番茄红素的提取工艺进行探索, 对于工业实际应用还有一些需要改进的地方^[10]。在细胞破碎方法上, 虽然热酸效率最高, 但该法操作步骤较为复杂, 用时相对较长, 热酸对番茄红素有一定的破坏作用, 因而工业上实际应用时可考虑采用效率同样不错的研磨法或者高压匀浆法, 结合酶法^[11-12], 可以减少番茄红素的损失, 使得提取效率进一步提高; 所用浸提剂的选择上, 在具体的某些行业(比如食品行业)对有毒的有机溶剂残留要求较严格, 这时可以采用提取效果稍低、但对人体无毒的乙酸乙酯作为浸提溶剂^[13]; 在提取条件上, 增加溶剂与菌体的接触以及进行多次萃取, 可以增加最终的番茄红素提取量^[14-15]。

参考文献:

- [1] CLINTON S K. Lycopene: chemistry, biology, and implication for human health and disease[J]. Nutr Rev, 1998, 56(2): 35-51.
- [2] BRAMLEY P M. Is lycopene beneficial to human health?[J]. Phytochemistry, 2000, 54(3): 233-236.
- [3] POHAR K S, GONG M C, BAHNSON R, et al. Tomatoes, lycopene and prostate cancer: a clinician's guide for counseling those at risk for prostate cancer[J]. World J Urol, 2003, 21(1): 9-14.
- [4] 陈锦屏, 孙灵霞, 段玉峰. 番茄红素性质及提取方法的研究[J]. 粮食与油脂, 2004(8): 50-53.
- [5] 蔡俊, 邱雁临, 谈小兰, 等. 番茄红素提取工艺的研究[J]. 食品与发酵工业, 2000, 26(2): 50-53.
- [6] 王海兵, 吴晓英, 洪秀云. 代谢调控物对红酵母累积番茄红素的影响[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(12): 64-67.
- [7] 杨文. 一种简单的胞壁破碎方法[J]. 微生物学通报, 1995, 22(1): 58-59.
- [8] 姚洪文, 郭素格, 范玉梅. 酵母细胞破碎技术的研究[J]. 中国酿造, 2005, 145(4): 32-34.
- [9] 李春生. 番茄红素的研究概况[J]. 农产品加工: 学刊, 2009(1): 71-74.
- [10] 杨翠竹, 李艳, 阮南, 等. 酵母细胞破碎技术的研究与应用进展[J]. 食品科技, 2006, 31(7): 138-142.
- [11] 曾子丹, 姚朔影. 红法夫酵母酶法提取条件研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(8): 91-93.
- [12] SEDMAK J J, WEERASINGHE D K, JOLLY S O. Extraction and quantitation of astaxanthin from phaffia rhodozyma[J]. Biotechnology Techniques, 1990, 4(2): 107-112.
- [13] 韩国廷. 番茄红素萃取工艺条件研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(30): 12998-12999.
- [14] 廖益强, 谢拥群, 黄彪. 番茄红素的生产方法[J]. 亚热带农业研究, 2007, 3(1): 64-68.
- [15] 刘红梅, 刘聚胜, 邹建. 番茄红素提取工艺研究综述[J]. 广西轻工业, 2011(3): 8-9.