

为料液比 1:25, 温度 100℃, 时间 4h。此时, 五味子中可溶性多糖的提取率(相对于被提取的五味子干重)为 5.38%。

配制蒽酮-硫酸试剂时要当日配制当日使用, 用蒽酮-硫酸法测多糖, 具有较高的灵敏度、精确性、准确性。

#### 参考文献:

- [1] 翟春. 普通念珠藻中多糖的提取、分离、纯化和初步结构分析的研究[D]. 广西大学, 2000.
- [2] 张国升, 樊明月, 等. 芦根多糖的提取及含量测定[J]. 安徽中医学院学报, 2002, 21(1): 51-52.
- [3] 朱加进. 苦菜中可溶性多糖提取工艺研究[J]. 农业工程学报, 2002, 18(1): 138-142.
- [4] 王扬, 王海洪, 等. 羊栖菜多糖的提取和分离[J]. 宁波大学学报, 2002, 15(1): 53-55.
- [5] 贾建会, 吕晓莲, 等. 深层发酵羊肚菌多糖的提取、分离及纯化研究[J]. 食品科学, 2002, 23(4): 59-62.
- [6] 刘成梅, 付桂明, 等. 百合多糖提取的影响因素研究[J]. 食品科学, 2002, 23(2): 87-89.
- [7] 李休远. 分离纯化及多糖鉴定[J]. 生物化学与生物物理学报, 1992, (6): 58-60.
- [8] 李春喜, 王志和, 王文林. 生物统计学(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002.

## 固氮菌 *β-CI* 株类胡萝卜素分离提取工艺优化的研究

杨秋明, 倪辉, 杨远帆

(集美大学生物工程学院, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 本文主要报导了破壁方法、浸提溶剂和工艺条件对从固氮菌 *β-CI* 菌株中提取类胡萝卜素影响的实验结果。用酸热法对 *β-CI* 菌株进行破壁处理最有利类胡萝卜素提取, 用正交实验法得出的最佳破壁工艺为: 盐酸的浓度 3mol/L, 盐酸的加量 30ml/g, 破壁时间 2min, 破壁温度 100℃。氯仿、丙酮、甲醇及乙醇等多种溶剂能取得良好的提取效果, 但综合考虑, 乙醇最理想; 用正交实验优化乙醇浸取的最佳条件为: 乙醇加量 30ml/g 菌体, 浸提温度为 50℃, 浸提时间 45min, 在优化后的条件下进行破壁提取 *β-CI* 菌中的类胡萝卜素, 提取得率为 3.45mg/g (干菌体)。

**关键词:** 固氮菌 *β-CI* 菌株; 类胡萝卜素; 提取; 优化

### Study on Optimization of the Working Conditions for Extracting Carotenoids from Azotobacter-strain *β-CI*

YANG Qiu-ming, NI Hui, YANG Yuan-fan

(Institute of Biotechnology, JiMei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** The cell-disrupting methods, solvent extracting and working conditions for extracting carotenoids from the Azotobacter strain *β-CI* were studied. The method of hot hydrochloric acid was the best to break the cell wall, and the optimal conditions obtained by orthogonal experiment were: concentration of HCl 3mol/L, HCl addition 30ml/g(dry cell), temperature 100℃ and time 2min. Ethanol was the suitable solvent as far as the toxin problem and application convenience were concerned. Besides the optimal conditions were: alcohol addition 30ml/g (dry cell), extracting temperature 50℃ and extracting time 45min. Under the optimal conditions for disrupting cell and extracting carotenoids, the extraction rate was 3.45mg/g.

**Key words:** Azotobacter strain *β-CI*; carotenoids; extraction; optimization

中图分类号: O652.6

文献标识码: B

文章编号: 1002-6630(2004)05-0109-04

收稿日期: 2003-09-18

作者简介: 杨秋明(1977-), 男, 助理实验师, 研究方向为发酵工程。

类胡萝卜素是自然界广泛存在的一大类深红紫色的脂溶性物质,其化学特性活泼,普遍具有较强的抗氧化功能,在生物体内,类胡萝卜素具有抗氧化,清除自由基、抗衰老、激活免疫力、抗肿瘤、机体着色等各种生物学功能<sup>[1]</sup>。针对类胡萝卜素的化学和生物活性,以类胡萝卜素为原料,可开发出着色剂、抗氧化剂、营养强化剂、保健因子等多种用途的产品<sup>[1,2]</sup>。近年来,随着人们对类胡萝卜素生理活性的逐渐认识以及人们生活水平的不断提高,以天然类胡萝卜为主要成分的食品、药品、化妆品越来越受到人们的青睐<sup>[2~4]</sup>。

类胡萝卜素的生产方法有化学法和生物法两种,化学法生产出的类胡萝卜含有顺反两种异构体,生物活性低,残留的微量中间体具有潜在的毒性,因而在食品、药品或化妆品中的应用受到了限制<sup>[5]</sup>。从天然植物(西红柿、胡萝卜)中提取类胡萝卜素效率低、工艺复杂、受气候季节限制、占用大量的耕地,生产的类胡萝卜素不仅成本高,价格昂贵,不能在食品领域中广泛应用,而且就其产量而言,远远满足不了日益增长的市场需求<sup>[5]</sup>。通过大面积培养藻类(杜氏盐藻、小球藻、雨生红球藻)来生产类胡萝卜素是近年研究较多的一种方法,取得了较大的突破<sup>[6,7]</sup>,但就藻类的生长特征(需要强光照、高浓度的盐分、高渗透压、生长周期长)而言,该法生产受气候的影响非常大,只适合于具有强光照的个别旱地区,产量上难以得到保证<sup>[8]</sup>。利用微生物发酵生产类胡萝卜素因具有高效、方便、易实现工业化的优点而受到人们的普遍关注,用该法生产类胡萝卜素的关键是寻找出优良性状的高产菌株,国内外在这方面都进行了大量的研究,目前用三孢布拉氏霉菌发酵 $\beta$ -类胡萝卜素已经实现了工业化生产,但该菌还存在生产周期长、多核菌体易退化、提取工艺复杂、生产成本较高等局限<sup>[9,10]</sup>。生产方法和生产技术上的局限,直接导致了类胡萝卜素的生产成本及使用成本的增高( $\beta$ -胡萝卜素市场售价平均\$600/kg,虾青素市场售价\$3500/kg)<sup>[10]</sup>,这大大限制了类胡萝卜素在食品工业中的应用。因此,如何降低成本,生产出价格适宜的天然类胡萝卜素是解决类胡萝卜应用与生产之间矛盾的关键。

$\beta$ -C1菌株是本实验室分离得到的一株固氮菌株,在改良慢型快长培养基上,它能积累大量的胞内类胡萝卜素。该菌生长快速、能利用廉价碳氮源、色素活性强,具有良好的市场和产业化前景。该菌具有稠厚的荚膜和坚硬的细胞壁,这不仅给分析研究带来了极大的不便,而且还可能导致动物吸收利用率低,因此,只有对该菌进行一系列的前处理,把其中的类胡萝卜素分离提取出来之后,才能对该菌的类胡萝卜素进行分析研究及加工利用。以此为出发点,本文拟针对固氮菌 $\beta$ -C1类胡萝卜素提取的问题进行研究,为该菌类胡萝卜素的

研究、开发、应用打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌体

固氮菌 $\beta$ -C1菌株,本实验室发酵培养并收集,其大致过程是将活化的斜面种子经三次扩培移入发酵罐发酵,发酵结束后经离心收集,冷冰干燥后105℃烘干至恒重。

### 1.2 仪器

7230型可见分光光度计(厦分);低速大容量多管离心机(LXJ-IIB);HH-6数显恒温水浴锅;101-3B型电热鼓风干燥器;冰箱;电子天平。

### 1.3 试剂

NaCl、NaOH、HCl 甲醛、氯仿、二甲亚砜、丙酮、乙醇、乙酸乙酸、无水硫酸钠均为分析纯, $\beta$ -胡萝卜素标准品(Sigma)。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 色素提取的基本流程

$\beta$ -C1菌体→破壁处理→溶剂浸提→固液分离(4000r/min, 10min)→色素转移→定容→色素分析

#### 1.4.2 类胡萝卜素含量的测定方法

用7230型分光光度计在454nm处测定浸提液吸光度,根据 $\beta$ -胡萝卜素标准品所制定的标准曲线计算得率。

#### 1.4.3 体破壁处理方法

1.4.3.1 酸热法 称取一定质量的干菌体,按12ml/g干菌体加入浓度为3mol/L的盐酸,在沸水浴中加热2min,迅速冷却,离心,洗涤沉淀部分,除去上清液,即得细胞碎片<sup>[11]</sup>。

1.4.3.2 研磨法 称取一定质量的干菌体,按0.45g/g干菌体加入石英砂研磨,同时按10ml/g干菌体加入丙酮作为助磨剂,研磨时间为15min,所得混合物直接用于浸提<sup>[11]</sup>。

1.4.3.3 细胞自溶法 称取一定质量的干菌体,加入5倍质量的水,并按4%的用量加入NaCl作为质壁分离剂,调pH6~7,控制温度55℃,自溶3h,之后以4000r/min离心15min<sup>[12]</sup>。

1.4.3.4 甲苯法 称取一定质量的干菌体,按6ml/g干菌体加入甲苯,于35℃破壁45min,然后离心(4000r/min)15min,去上清液即为细胞碎片<sup>[11]</sup>。

1.4.3.5 二甲亚砜法 称取一定质量的干菌体,以15ml/g干菌体的量加入二甲亚砜,加热至55℃,维持5min。

## 2 结果与分析

2.1 不同破壁方法对固氮菌  $\beta$ -CI 菌株类胡萝卜素提取率的影响

表1 几种破壁方法效果比较

细胞破壁方法	不破壁处理	甲苯法	自溶法	二甲亚砷法	研磨法	酸热法
提取得率(mg/g)	0.65	0.67	1.356	2.304	1.83	2.51

表1是不同前处理方法对 $\beta$ -CI菌株类胡萝卜素提取效果影响的实验效果,从中可以看出,酸热法破壁效果最好,色素得率为2.51mg/g干菌体;二甲亚砷法破壁法次之,色素的提取率为2.304mg/g干菌体。与其他前处理方法相比,酸热法不仅破壁效果好,有利于类胡萝卜素的提取,而且还具有操作方便、酸液可回收重复利用、色素易分离等优点。

2.2 酸热法破壁条件的优化

表2 酸一热法破壁正交实验设计案

水平	因 素			
	A(ml/g)	B(mol/L)	C(min)	D(°C)
1	10	2	2	40
2	20	3	3	70
3	30	4	4	100

注: A 是盐酸的用量; B 代表的是盐酸的浓度; C 代表的是沸水浴的时间; D 代表破壁处理时盐酸液的温度。

按表2所示的因素水平用正交方法对 $\beta$ -CI菌破壁条件进行优化研究,实验如果如表3。从表3可以看出,各因素对实验结果影响大小程度依次为 $B > A > D > C$ ,即盐酸的浓度对破壁效果的影响最大,其次为酸液的加量和破壁的温度,而破壁的时间对破壁效果的影响最小,根据极差分析可得出最优的破壁条件为: $A_3B_2C_1D_3$ ,即酸液的加量为30ml/g,酸的浓度为3mol/L,破壁时间为2min,破壁温度为100℃。

表3 正交实验结果及极差分析表

实验号	因 素				色素得率 (mg/g)
	A	B	C	D	
1	1	1	3	2	1.8
2	2	1	1	1	1.83
3	3	1	2	3	2.31
4	1	2	2	1	2.37
5	2	2	3	3	2.68
6	3	3	1	2	2.75
7	1	3	1	3	2.62
8	2	3	2	2	2.4
9	3	3	3	1	2.68
K <sub>1</sub>	2.27	1.98	2.39	2.29	
K <sub>2</sub>	2.34	2.60	2.36	2.32	
K <sub>3</sub>	2.58	2.56	2.38	2.54	
R	0.31	0.62	0.03	0.25	

表4 不同溶剂对类胡萝卜素提取效果的影响

溶剂	乙醇	丙酮	氯仿	乙酸乙酯	甲醇	正己烷	石油醚
色素得率(mg/g)	2.59	2.64	2.69	2.09	2.62	1.93	1.90

2.3 不同溶剂对 $\beta$ -CI菌株类胡萝卜素提取效果的影响

在室温条件下,以10ml/g的溶剂添加量用不同有机溶剂浸提破壁的 $\beta$ -CI菌体10min,实验结果(如表4)表明,乙醇、丙酮、氯仿、甲醇等四种溶剂浸提效果较好,相互间的差别不大,其中氯仿的提取效果最好,色素得率为2.69mg/g。综合考虑,氯仿、丙酮和甲醇虽然提取效果较好,但存在着一定毒性,乙醇的提取效果虽然略次于氯仿、丙酮和甲醇,但其安全性高,即使少量残留在色素中,也不会造成残留毒性,从这个意义上考虑,选用乙醇作为提取溶剂显然更具应用价值。

表5 浸提正交实验和因素水平

水平	因 素		
	A(ml/g)	B(°C)	C(min)
1	20	-20	15
2	30	15	45
3	40	50	75

表6 浸提条件正交实验及结果

实验号	因 素			色素得率 (mg/g)
	A	B	C	
1	1	1	1	1.90
2	1	2	2	2.43
3	1	3	3	2.22
4	2	1	3	2.48
5	2	2	1	2.98
6	2	3	2	3.04
7	3	1	2	2.90
8	3	2	3	2.52
9	3	3	1	2.96
K <sub>1</sub>	2.18	2.42	2.58	
K <sub>2</sub>	2.83	2.64	2.79	
K <sub>3</sub>	2.8	2.74	2.4	
R	0.65	0.31	0.38	

2.4 浸提条件 $\beta$ -CI菌株类胡萝卜素提取率的影响

称取等量的破壁后 $\beta$ -CI菌体,以乙醇为提取溶剂,按表5所示的因素水平进行正交实验,实验结果(如表6)表明,各因素对浸提效果影响大小的程度依次为 $A > C > B$ ,由极差分析可以得出最佳的提取条件为 $A_2B_3C_2$ ,即乙醇的加量为30ml/g,浸提温度为50℃,浸提时间为45min。

2.5 验证实验

根据以上优化后实验结果,称取一定的 $\beta$ -CI干菌

体,以30ml/g的添加量加入3mol/L盐酸,100℃处理2min,离心弃上清液,沉淀以30ml/g(干菌体)的量添加乙醇,50℃浸提45min,进行类胡萝卜素提取实验。最终类胡萝卜素提取得率3.45mg/g(干菌体)。

### 3 结 论

通过以上实验结果的分析与讨论,可以得出以下结论:

3.1 酸热破壁法是从固氮菌  $\beta$ -CI 菌中提取类胡萝卜素的良好破壁方法。

3.2 氯仿、丙酮、乙醇、甲醇等多种有机溶剂都较好地提取出固氮菌  $\beta$ -CI 菌株细胞碎片中的类胡萝卜素,但综合考虑,乙醇更适于应用。

3.3 通过两次正交实验确定的用酸热法破壁,乙醇浸提的最佳类胡萝卜提取条件为:酸液的加量为20ml,酸的浓度为3mol/L,破壁时间为2min,破壁温度为100℃,乙醇的加量为15ml,浸提温度为50℃,浸取时间为45min。在此条件下, $\beta$ -CI 菌株中类胡萝卜素的提取得率3.45mg/g(干菌体)

#### 参考文献:

- [1] 王业勤,李勤生.天然类胡萝卜素—研究进展、生产、应用[M].北京:中国医药出版社,1997.
- [2] 赵文恩,韩雅珊,戴蕴青.类胡萝卜素的生物学性质[J].生物化学杂志,1998,15(3):1-3.
- [3] Garry J Handelman, PhD. The evolving role of carotenoids in human biochemistry[J]. Nutrition, 2001,17(10):818-822.
- [4] 李和生,王鸿飞.海藻中的类胡萝卜素及其在食品等领域中的应用[J].宁波大学学报,2000,13(4):92-95.
- [5] 张博润,寇运同,刘玉方.胡萝卜素生产菌粘红酵母NR-5的培养优化条件研究[J].微生物学通报,1995,22(4):212-214.
- [6] 李建宏,翁永萍,胡寒萍,等.不同氮源对盐生杜氏藻生长和 $\beta$ -胡萝卜素积累的影响[J].南京师大学报,1999,22(4):212-214.
- [7] 郭健.杜氏藻培养生产 $\beta$ -胡萝卜素研究进展[J].农牧产品开发,2001,(5):4-7.
- [8] 刘家永,吴鸣建,沈国鹏,等.天然 $\beta$ -胡萝卜素的研究[J].郑州工业大学学报,1999,20(4):59-62.
- [9] 任双喜,尹光琳.在袍布拉氏霉菌生物合成 $\beta$ -胡萝卜素的研究[J].微生物学通报,1998,25(1):20-23.
- [10] 姜文候,单志萍,孟好.微生物产生的类胡萝卜素及其工业化[J].食品与发酵工业,1998,25(3):46-51.
- [11] 王岁楼,张鑫,张平之.红酵母类胡萝卜素提取方法研究[J].食品与机械,2000,80(6):30-31.
- [12] 蔡俊.啤酒废酵母细胞壁破壁研究[J].酿酒,2001,28(4):104-105.
- [13] Sedmak J J, Weerasinghe D K, Jolly S O. Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*[J]. Biotechnol Tech, 1990,(4):107-112.

## 多穗柯中黄酮类物质提取工艺的研究

肖坤福,廖晓峰,催艳娟,任春生  
(东华理工学院应用化学系,江西 抚州 344000)

**摘 要:**该文研究了水提法、传统的醇回流法提取多穗柯叶中总黄酮类化合物的提取工艺,并使用正交试验确定了最佳提取条件。试验结果表明:最佳提取条件为  $A_2B_3C_2$ ;即用25倍量80%的乙醇连续回流提取2h。

**关键词:**多穗柯;提取工艺;黄酮;正交实验

### Study on the New Extraction Methods of the Flavonoids in *Lithocarpus Polysachyus* Rehd

XIAO Kun-fu, LIAO Xiao-feng, CUI Yan-juan, REN Chun-sheng  
(Department of Applied Chemistry ECGI, Fuzhou 344000, China)

**Abstract:** In this paper the technics about water elute and anhychous alcohol regurgitant methods to distill total flavonoid compound in *Lithocarpus polysachyus* rehd were studied. The optimal technics by orthogonal experiment design were applied.

Results indicated: the optimal technics was  $A_2B_3C_2$ , i.e., 25 times quantity of the 80% alcohol circulating 2h.

收稿日期:2003-08-22

作者简介:肖坤福(1978-),男,硕士研究生,研究方向为天然产物。