

# 酿酒酵母中提取麦角甾醇的研究

薛冬桦, 李亚丽, 李秀萍, 吕君男, 马丽娟

(长春工业大学生物工程学院, 吉林 长春 130012)

**摘 要:** 以酿酒干酵母为原料, 在适量甲醇和氢氧化钾溶液中, 95℃水浴皂化回流 2.5h, 用有机溶剂乙醚萃取麦角甾醇, 减压浓缩富集。4~-7℃缓慢降温结晶, 获得麦角甾醇粗品, 产率为 1.11%。将麦角甾醇粗品溶解于乙醚溶剂中, 重结晶得到纯度较高的麦角甾醇晶体, 平均产率为 0.69%, 提取率可达 62.58%。采用电子扫描显微镜对恒温结晶和降温结晶得到的晶体进行晶貌观察, 利用红外光谱法进行麦角甾醇的结构表征。

**关键词:** 麦角甾醇; 酵母; 提取; 结晶

## Study on Extraction Process of Ergosterol from *S. cerevisiae* Dry Yeast

XUE Dong-hua, LI Ya-li, LI Xiu-ping, LÜ Jun-nan, MA Li-juan

(School of Biological Engineering, Changchun University of Technology, Changchun 130012, China)

**Abstract:** Dry yeast *S. cerevisiae* as raw material, dissolve it in the solution of 20% potassium hydroxide, saponify and reflux it for 2.5h at 95℃, extract with diethyl ether, concentrate it and drop gradually it in temperature from 4℃ to -7℃ to get ergosterol crystal. The next step is to dissolve the crude product in the diethyl ether and to recrystallize with gradual temperature lowering, so the crystal of the ergosterol is obtained. The yield of the ergosterol crystal is 0.69% (relative to the dry yeast), and the extract rate can achieve 62.58%. Scanning electron microscope (SEM) is employed to observe the morphology of the ergosterol and the infrared Fourier transform spectrometer is used to record the infrared spectrum of the ergosterol.

**Key words:** ergosterol; yeast; extract; crystal

中图分类号: Q548

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)05-093-04

麦角甾醇, 是脂溶性 VD<sub>2</sub> 的前体, 当受到紫外线照射时可转化成 VD<sub>2</sub><sup>[1]</sup>, 而且也是甾醇类激素药物的原料, 在食品、医药和饲料工业应用广泛<sup>[2]</sup>。目前, 我国麦角甾醇生产能力较低, 无法满足市场需求。因此, 采用微生物发酵法培养富含麦角甾醇的酵母<sup>[3-6]</sup>, 研究麦角甾醇的提取工艺, 优化工艺条件, 提高麦角甾醇的产量, 使其产业化具有重要的社会效益和经济效益。

麦角甾醇提取及分析方法, 国内外已有研究, 多采用醇碱皂化分离麦角甾醇, 再利用有机溶剂提取麦角甾醇<sup>[7-8]</sup>。还有用物理法将细胞破碎进行麦角甾醇提取的研究<sup>[9]</sup>。麦角甾醇不溶于水, 但易溶于有机溶剂, 在大多数情况下, 均用分光光度法测定麦角甾醇含量<sup>[10-12]</sup>。目前关于角麦固醇菌种筛选, 发酵工艺的报道较多而分离纯化的研究少见。

因此, 本实验旨在研究提取及纯化麦角甾醇的工艺过程, 通过一系列的实验, 确定出在此实验条件下的最佳皂化条件及结晶参数, 从而可提高酵母中麦角甾醇

的提取率, 以适应工业化生产。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与药品

麦角甾醇标准样品 美国 Sigma 公司; 酿酒酵母 湖北安琪酵母股份有限公司; 氢氧化钾、甲醇、乙醚、乙醇、氯仿、正庚烷均为国产分析纯; 溴化钾为光谱纯。

### 1.2 仪器与设备

电热恒温水浴锅 天津市泰斯特仪器有限公司; RE 52-98 型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; UV-755B 型紫外可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司; GL-21M 型冷冻离心机 上海市离心机械研究所; ZK-82A 型真空干燥箱 上海市实验仪器总厂; 日本 JSM-5500LV 型扫描电子显微镜 (分别在 15kV 和 20kV 的加压条件下得其扫描电镜图片); Nicolet AVATAR360 FTIR 红外光谱仪 (溴化钾压片制样)。

收稿日期: 2006-05-28

基金项目: 吉林省发改委高新技术产业处重点基金资助项目 (吉计资字 2002895)

作者简介: 薛冬桦 (1956-), 女, 教授, 主要从事发酵工程研究。

### 1.3 方法

准确称取干酵母 10.0000g, 溶于 70ml 氢氧化钾溶液 (20%), 加入 5ml 甲醇, 95℃ 水浴中皂化回流 2.5h。自然冷却至室温后, 加 70ml 乙醚抽提, 剧烈震荡 15min, 然后转入分液装置中静止 2.0h 后分液, 用紫外分光光度法测上清液麦角甾醇含量。据比尔定律, 计算麦角甾醇含量。

$$\text{麦角甾醇}(\%) = CV/W \times 100$$

式中, C 为萃取样品中麦角甾醇浓度 (mg/ml); V 为萃取溶剂体积 50ml; W 为干酵母质量 10g。

然后将上层乙醚液于 40℃ 真空浓缩至 10min, 在 4℃ 条件下静止结晶。

麦角甾醇标准曲线的绘制。用紫外分光光度计测酵母中麦角甾醇的含量<sup>[13]</sup>, 先要绘制标准曲线, 方法如下: 准确称取麦角甾醇标准样品 5mg, 定溶于 50ml 乙醚中 (0.1mg/ml), 分别吸取 2、4、6、8 和 10ml, 定溶到 10ml 乙醚溶液, 可得一系列标准浓度样品, 在波长 282nm 处, 分别测得吸光度, 绘制标准曲线与方程。

$$\text{麦角甾醇溶解度计算公式: } S/100 = CV/\rho V$$

式中, S 为溶解度; C 为麦角甾醇浓度; V 为饱和溶液体积 5ml;  $\rho$  为溶剂密度。

晶体经离心沉淀分离得麦角甾醇粗品, 粗品溶于 10ml 乙醚中重结晶, 置于真空干燥装置, 在 45℃ 恒温后称量, 计算产率及提取率。采用电子扫描显微镜对恒温结晶和降温结晶得到的晶体进行晶貌观察, 利用红外光谱对麦角甾醇结构进行表征。

## 2 结果与分析

### 2.1 提取工艺过程

干酵母 → 皂化 (醇, 20% 碱 2:3) → 萃取 (乙醚) → 浓缩结晶 → 重结晶 → 麦角甾醇纯品

### 2.2 提取溶剂选择

麦角甾醇不溶于水, 易溶于有机溶剂。为了进一步选择溶解性比较好的提取剂, 进行麦角甾醇在不同有机溶剂中的溶解度实验研究。本实验分别用乙醚、乙醇、氯仿和正庚烷作为提取溶剂, 配制麦角甾醇在四种不同有机溶剂中的标准溶液, 用紫外分光光度计在 282.5nm 处测定了不同浓度条件下麦角甾醇溶液的吸光度, 以浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线 (图 1)。由图 1 可看出, 麦角甾醇在以上四种有机溶剂中的标准曲线的线性都比较好。同时在室温条件下 (18℃), 进行麦角甾醇在不同提取溶剂溶解度的对比实验 (表 1)。

表 1 麦角甾醇在不同有机溶剂中的溶解度 (18℃)  
Table 1 Solubility of ergosterol in deferent organic solvents (18℃)

有机溶剂	乙醚	乙醇	正庚烷	氯仿
溶解度 ( $\text{g} \times 10^{-3}$ )	33.91	68.80	25.04	35.36

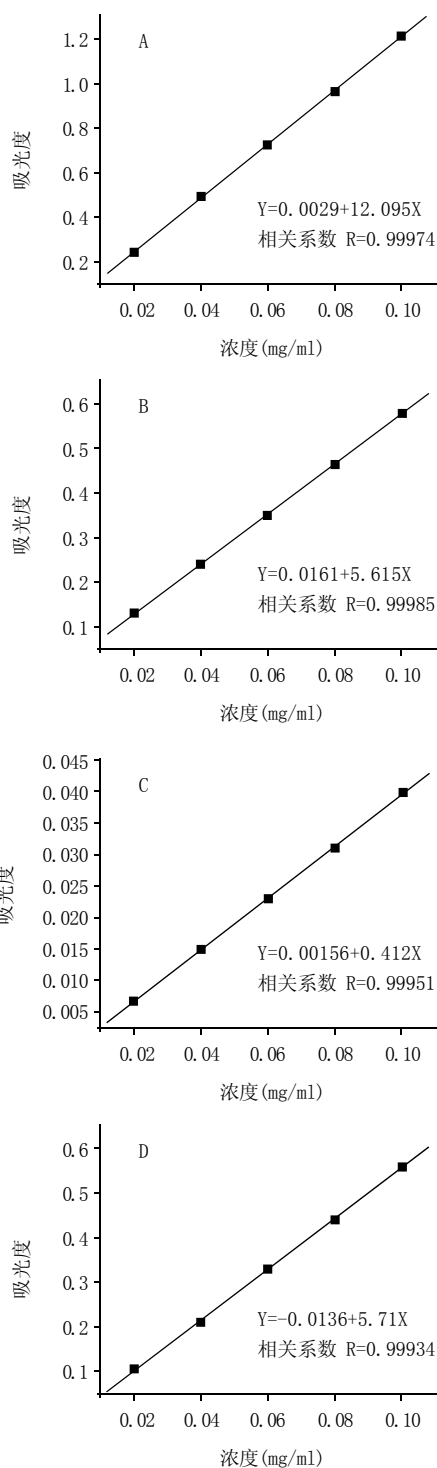


图 1 麦角甾醇在四种有机溶剂中的标准曲线  
Fig.1 Standard curves of ergosterol in four organic solvents

根据表 1, 可看出麦角甾醇在四种有机溶剂中的溶解度大小由大到小的顺序依次为: 乙醇 > 氯仿 > 乙醚 > 正庚烷。但是由于麦角甾醇在正庚烷中溶解度太小, 乙醇与水可按任意比例互溶, 不能够直接做萃取有机溶

剂, 氯仿的密度比水大, 除杂工艺非常困难, 因此从除杂、结晶难易度、萃取效果及终产物纯度等方面考虑, 目前最好的萃取有机溶剂是乙醚。故以乙醚为萃取剂进行以下的萃取实验。

### 2.3 皂化条件对麦角甾醇提取的影响

皂化是一种酯与碱, 混合加热产生的反应, 可生成游离醇和酸盐。皂化是提取麦角甾醇的关键技术之一, 酵母在氢氧化钾的甲醇溶液中进行皂化反应分离麦角甾醇。通过正交试验, 得麦角甾醇的提取率(表2)。从表2可以得出结论: 各因素对试验指标的影响次序为: 皂化时间→醇碱比→皂化温度, 最佳方案应当是 $C_3A_2B_2$ 。即确定出皂化时间2.5h, 醇碱比1:20, 皂化温度95℃为最佳的工艺条件。

表2 麦角甾醇皂化正交试验表  
Table 2 Cross-tests of ergosterol's saponification

试验组	醇碱比(V:V)	皂化温度(℃)	皂化时间(h)	吸光度
1	1:15	90	1.5	0.872
2	1:20	90	2.0	1.005
3	1:25	90	2.5	1.091
4	1:15	95	2.0	1.112
5	1:20	95	2.5	1.244
6	1:25	95	1.5	1.018
7	1:15	100	2.5	0.991
8	1:20	100	1.5	0.798
9	1:25	100	2.0	0.994
$K_1$	2.968	2.975	2.688	
$K_2$	3.374	3.047	3.111	
$K_3$	2.783	2.912	3.326	
$k_1$	0.989	0.992	0.896	
$k_2$	1.125	1.016	1.037	
$k_3$	0.928	1.034	1.109	
R	0.197	0.042	0.213	
最佳方案	$A_2$	$B_2$	$C_3$	$C_3A_2B_3$

### 2.4 结晶温度的选择

根据上述麦角甾醇在不同有机溶剂的溶解度实验, 确定麦角甾醇在乙醚中不同温度条件下溶解度曲线(图

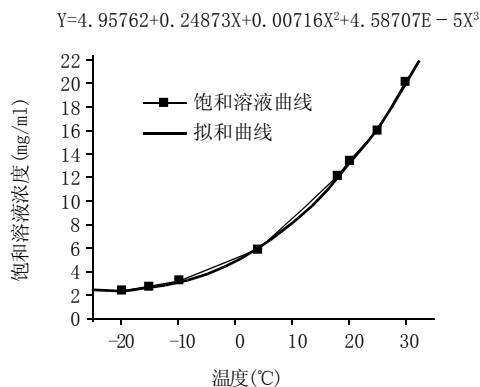


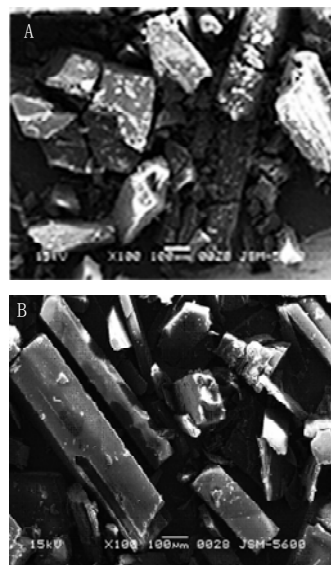
图2 麦角甾醇溶解度曲线  
Fig.2 Solubility curve of ergosterol

2)。由图2可见, 4℃是曲线切点, 当温度大于4℃时, 溶解度较大, 晶体很难析出; 温度小于4℃时, 溶解度较小, 形成晶体细小, 不利于冷冻离心沉淀过程。因此, 选择在4℃条件下进行结晶实验。

### 2.5 恒温结晶与降温结晶比较

为了比较恒温结晶和降温结晶的影响, 进行恒温结晶和降温结晶实验。实验中可见4℃恒温结晶时, 4h以后, 结晶容器下部会出现细小白色针状晶体, 上部还有一些絮状物, 10h后上部仍有絮状物。当进行降温结晶时, 把上述4℃晶体缓慢降至-7℃, 实验发现2h以后形成均匀且粒度较大的麦角甾醇晶体。

为了观察不同实验条件下从酵母中提取得麦角甾醇晶体的晶体形貌, 采用JSM-5500LV型扫描电子显微镜(SEM)在加速电压为15kV的条件下观察其图像(图3)。从图3可明显的看出, 图B降温结晶得到的晶体粒度大而且均匀, 我们认为选取4℃到-7℃这样的温度范围进行缓慢降温较好。因此选择降温结晶工艺进行麦角甾醇结晶研究。



A. 恒温结晶扫描电镜图像; B. 降温结晶扫描电镜图像。

图3 麦角甾醇结晶扫描电镜图

Fig.3 SEM image of ergosterol

### 2.6 麦角甾醇晶体的产率与收率

使用正交试验得到的最佳条件进行酵母皂化反应, 提取分离酵母细胞中的麦角甾醇, 通过紫外分光光度法

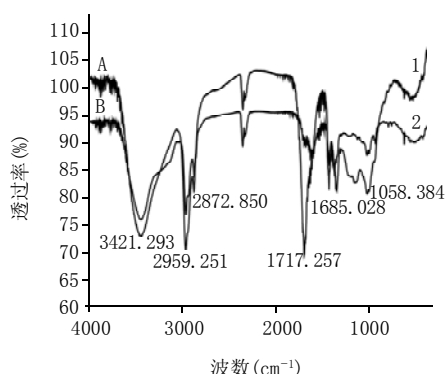
表3 麦角甾醇的产率  
Table 3 Yield of ergosterol

组别	原料(g)	萃取液产率(%)	晶体产率(%)	麦角甾醇提取收率(%)
1	10.0002	1.09	0.68	62.39
2	9.9997	1.13	0.70	61.95
3	10.0004	1.12	0.71	63.39
平均值	10.0001	1.11	0.69	62.58

测得细胞内麦角甾醇含量(表3),然后采用4℃恒温静止结晶法得到晶形较好的白色针状麦角甾醇晶体。通过前述的计算方法,得到麦角甾醇的产率。实验结果表明:酵母中麦角甾醇晶体平均产率为0.69%,提取率达62.58%。

### 2.7 红外光谱定性分析

采用压片法对麦角甾醇晶体进行制样,将1~2mg样品与100~200mg干燥的溴化钾粉末制成薄片,用红外光谱仪(Nicolet AVATAR-360FTIR)在 $4000\text{cm}^{-1}$ 和 $400\text{cm}^{-1}$ 之间测定 $\text{C}_{28}\text{H}_{43}\text{OH}$ 的红外光谱特性。



1. 实验室提取的麦角甾醇红外光谱谱图; 2. 美国 SIGMA 公司的麦角甾醇标准品谱图。

图4 麦角甾醇红外谱图  
Fig.4 FTIR spectrum of ergosterol

如图4所示,在 $3421.29\text{cm}^{-1}$ 、 $2959.25\text{cm}^{-1}$ 、 $2872.88\text{cm}^{-1}$ 以及 $1456.19\text{cm}^{-1}$ 和 $1382.79\text{cm}^{-1}$ 等处均出现强的吸收峰,它们分别是环己烷羟基( $-\text{OH}$ )的伸缩振动,碳碳双键( $-\text{C}=\text{C}-$ )的伸缩振动和变形振动,甲基( $-\text{CH}_3$ )的反对称伸缩振动和对称伸缩振动,以及甲基( $-\text{CH}_3$ )的反对称变形振动和对称变形振动产生的吸收峰。由以上红外光谱谱图分析,我们可以确定所测样品结构符合麦角甾醇分子结构,由此可以定性的说明我们提取得到了结构完整的麦角甾醇晶体。谱图中样品谱峰的波数与标准样品的有些位移,分析可能的原因是在样品制备过程中由于样品的厚度,形状以及测试条件的细微差别所引起的。

### 3 结 论

以酵母为原料,运用皂化-萃取-结晶的方法提取麦角甾醇,研究了不同皂化条件和结晶条件对麦角甾醇晶体产率和质量的影响。实验结果表明,在碱醇体积比1:20,温度 $95^\circ\text{C}$ 的条件下皂化2.5h为最佳皂化条件;用乙醚抽提麦角甾醇,得出在 $4\sim-7^\circ\text{C}$ 降温结晶所得晶体质量最佳的结论。重结晶后平均产率可高达0.69%,提取率可达62.58%,将对麦角甾醇的工业化生产提供科学依据。

### 参考文献:

- [1] 邓玉清,王纪,虞龙. 微生物麦角甾醇的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2001, 21(3): 45-47.
- [2] TUOHIMA P, LYAKHOVICH A, AKSENOV N. Vitamin D and prostate cancer[J]. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 76: 125-134.
- [3] 惠丰立,魏明卉,褚学英. 酵母菌产麦角甾醇发酵条件的研究[J]. 生物技术, 2003, 13(6): 28-29.
- [4] 薛冬桦,卢晓霆,金花,等. 生物合成麦角甾醇酵母菌株选育[J]. 长春工业大学学报, 2003, 24(3): 16-18.
- [5] XUE Dong-hua. The study and development of ergosterol-rich yeast [C]//International Symposium on Corn Deep Processing, Changchun, China, 1997: 353-371.
- [6] 赵茜,陈永泉,李秉滔. 抗生素结晶工艺优化方法[J]. 国外医药抗生素分册, 2001, 22(5): 207-210.
- [7] ABRAMSON D, SMITH D M. Determination of ergosterol in canola by liquid chromatography[J]. Journal of Products Research, 2003, 39: 185-191.
- [8] WHITE T C, MARR K A, BOWDEN R A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance[J]. Clin Microbiol Rev, 1998(11): 382-402.
- [9] GONG P, GUAN Xin, WITTER E. A rapid method to extract ergosterol from soil by physical disruption[J]. Applied Soil Ecology, 2001, 17: 285-289.
- [10] 钱寿根. 用紫外分光光度法测定酵母中麦角甾醇的含量[J]. 食品与发酵工业, 1987(6): 48-51.
- [11] 谢和金,卢毅,邱咏梅,等. 高效液相色谱法测定酵母中麦角甾醇含量[J]. 生物工程进展, 2000, 20(4): 75-76.
- [12] DELAREAU J. Rapid determination of ergosterol by HPLC[J]. Spectra, 2000, 91(12): 29-31.
- [13] YOUNG J C. Microwave-assisted extraction of the fungal metabolite ergosterol and total fatty acids[J]. Agric Food Chem, 1995, 43: 2904-2910.

美国《化学文摘》收录期刊