

从紫色非硫细菌中提取类胡萝卜素研究

李福枝, 刘 飞

(湖南工业大学 绿色包装与生物纳米技术应用重点实验室, 湖南 株洲 412008)

摘要: 探讨了紫色非硫细菌中类胡萝卜素提取的影响因素, 包括提取温度、提取时间、溶剂用量、皂化等, 并对提取色素进行了初步分析。结果表明: 提取温度为 49 °C, 提取时间为 4 h, 丙酮溶剂用量为 5 mL/g 菌泥的条件下提取类胡萝卜素的效果好; 皂化能除去提取液中残留的叶绿素并水解类胡萝卜素酯, 提高提取物的纯度等。

关键词: 类胡萝卜素; 影响因素; 皂化

中图分类号: Q562

文献标识码: A

文章编号: 1673-9833(2007)03-0078-03

Research on Carotenoids Extraction from *nonsulphur purple bacteria*

Li Fuzhi, Liu Fei

(Key Lab of Green Packing and Application of Biological Nanotechnology, Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412008, China)

Abstract: The influence factors on carotenoids extraction from *nonsulphur purple bacteria* were researched, which included extraction time, extraction temperature, solvent dosage and saponification. And primary analysis for the carotenoids extraction was made. As a results, the best extraction temperature was 49 °C, the best extraction time was 4 hours and the best solve dosage was 5 milliliters acetone to one gram bacteria mud. Then Saponification could get rid of residue chlorophyll from cartoenoids and hydrolyze carotenoids esters, so that it improved its purity.

Key words: carotenoids; influential factors; saponification

类胡萝卜素是一类由 8 个类异戊二烯组成的碳氢化合物, 不仅可用作食品、药物、化妆品和饲料的添加剂和着色剂, 还具有提高免疫力、抗氧化、抗紫外线等功能^[1], 如 α -类胡萝卜素、 β -类胡萝卜素、玉米黄质是维他命原, 能够防治眼病、预防心血管疾病、防光敏性疾病和白内障等^[2]。类胡萝卜素是天然色素开发的一个主要方向, 而从微生物发酵中生产类胡萝卜素是现阶段一个新的研究方向。

紫色非硫细菌属于光合细菌, 它含有较高浓度的类胡萝卜素, 同时也含有丰富的营养和生理活性物质, 不仅可作为提取天然类胡萝卜素的原料, 还可将全部细胞作为色素单细胞蛋白。目前, 有关从紫色非硫细菌中提取类胡萝卜素的研究报道不是很多, 且在

提取方法及其影响因素方面还有不少工作可做。

本文先重点研究了类胡萝卜素提取过程中提取时间、提取温度、溶剂用量、皂化对提取效果的影响。并用紫外-可见光谱法和高效液相色谱法对类胡萝卜素组分进行了初步定性, 为开发、利用光合细菌及其类胡萝卜素提供理论和实验方面的数据和资料。

1 实验材料和方法

1.1 主要仪器和试剂

双光束-紫外可见分光光度计: TU-1901, 北京谱析通用; 高效液相色谱仪: LC-20A, 岛津; 丙酮、乙醚、乙醇、甲醇、KOH 均为分析纯。

收稿日期: 2006-12-19

作者简介: 李福枝(1978-), 女, 湖南常德人, 湖南工业大学讲师, 湖南工业大学在职硕士生, 主要从事生物材料和生物色素方面的研究。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种和培养方法

菌种: 绿色包装与生物纳米技术应用实验室保存的一株紫色非硫细菌科(PNSB)菌种。

培养基: KH_2PO_4 0.6 g, K_2HPO_4 0.9 g, 酵母膏 1.5 g, 蛋白胨 2.0 g, NaHCO_3 0.5 g, 硫酸镁 0.3 g, 氯化钙 0.2 g, pH 7.0~8.0, 蒸馏水 1 000 mL。

培养方法: 连续光照厌氧培养 5~7 d, 培养温度 28~30 °C, 光照强度 1 500 lux~2 000 lux。

1.2.2 类胡萝卜素的提取方法

类胡萝卜素的提取方法参见文献[3]且有改动: 用碱性 CaCl_2 沉淀细胞液, 倾去上清液, 再抽滤得到细胞滤泥(湿, 捏而不滴水), 用乙醇浸泡^[4]细胞泥 0.5 h 后用丙酮浸泡提取, 用 100 mL 丙酮于室温下浸泡过夜, 合并萃取液, 45 °C 下负压蒸发回收丙酮, 再转移到等量的乙醚中, 用蒸馏水洗去残留的丙酮及其它无色极性杂质, 10% 的 KOH 甲醇溶液皂化 2 h, 蒸馏水洗去残留的醇和碱, 将上清液于旋转蒸发器内负压浓缩。

1.2.3 紫外可见分光光度法

使用 TU-1901 双光束紫外可见分光光度计对类胡萝卜素提取液和标准品进行光谱扫描, 以初步反映类胡萝卜素含量的高低。

1.2.4 类胡萝卜素含量的计算方法

总类胡萝卜素含量计算式为:

$$M\%(\text{ug/g}) = (A_1 \times V \times N \times 10^4) / (A_0 \times W)^{[5]}$$

式中: A_1 为 475 nm 处样品的吸光值; A_0 为 475 nm 处标准样的吸光系数, 一般为 2 500; V 为样品提取液的总体积(单位为 mL); W 为样品的总质量(单位为 g); N 为提取液的稀释倍数。每个数据均取 3 次测量的平均值。

1.2.5 高效液相色谱条件

色谱柱 Spherisorb ODS-2, C_{18} , 直径 4.6×250 (mmL D. \times mm), 5 μm 粒度; 流动相 A 为甲醇: 水=95:5, B 为乙酸乙酯; 洗脱梯度: 0~10 min, (0~25%)B; 10~15 min, (25%~33%)B; 15~20 min, (33%~50%)B; 20~25 min, (50%~25%)B; 25~30 min, 25%B。流速: 1.0 mL/min, 进样量为 20 μL , 柱温为 24 °C, 检测器波长为 475 nm。

2 结果与讨论

2.1 温度对类胡萝卜素提取效果的影响

在不同的温度下提取紫色非硫细菌中的类胡萝卜素, 研究温度对提取类胡萝卜素的影响, 选出最适宜的提取温度, 以提高类胡萝卜素的提取效果。试验结果见图 1。

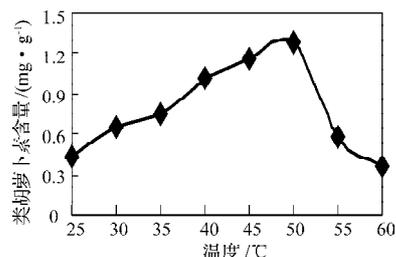


图 1 温度对提取类胡萝卜素的影响

Fig. 1 Effect of temperature on extraction

图 1 表明, 提取紫色非硫细菌中的类胡萝卜素的最佳温度是 49 °C, 温度低于 49 °C 时类胡萝卜素的提取效果随着温度的升高而加大, 温度高于 50 °C 会导致类胡萝卜素的含量减少。原因可能是在类胡萝卜素提取方法中, 随着温度的上升, 丙酮的挥发性增强, 一部分类胡萝卜素会随着丙酮的挥发而损失掉; 类胡萝卜素分子中存在共轭双键结构, 共轭双键对氧和高温是敏感且不稳定的, 容易发生自氧化和光敏氧化, 或者分子重排, 这些变化会使紫外-可见吸收光谱产生红移或蓝移^[6], 从而减少了吸光度, 导致计算类胡萝卜素的含量时数值会下降。所以, 应用本文 1.2.2 中的方法来提取类胡萝卜素, 最适宜的温度是 49 °C, 可以适当添加抗氧化剂来保护提取过程中类胡萝卜素不被氧化, 如 0.3% 的 V_E 或 0.2% 的抗坏血酸钠。

2.2 提取时间对类胡萝卜素提取效果的影响

从紫色非硫细菌中提取类胡萝卜素的时间一般很长, 在室温下浸提 12 h 才能接近提取完全的程度, 本试验在最适温度 49 °C 下研究提取时间对类胡萝卜素提取效果的影响, 观察在提高温度的情况下能否缩短提取时间, 结果见图 2。

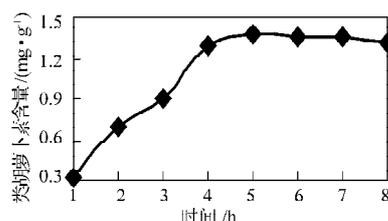


图 2 时间对提取类胡萝卜素的影响

Fig. 2 Effect of time on extraction

图 2 表明, 在浸提 4 h 后类胡萝卜素含量就已经达到最大, 延长提取时间不仅不能增加提取量, 反而会减少类胡萝卜素的产量。

2.3 皂化对提取效果的影响

类胡萝卜素提取液中含有类胡萝卜素酯, 如类胡萝卜素醇酯、类胡萝卜素酸酯^[7]和残留的细菌叶绿素, 两者的存在将会降低类胡萝卜素的纯度和生物功能。皂化的目的就是为除去提取液中残留的细菌叶绿素和水解类胡萝卜素酯生成类胡萝卜素单体, 以提高纯度和功能。本试验按照 1.2.2 中的方法来提取类胡萝卜素, 在皂化前于紫外可见分光光度计做光谱扫描, 在皂化前和

皂化 1.5 h 后各测光谱扫描; 另外, 本试验还用乙醇浸泡提取的最初滤液做了光谱扫描, 具体结果见图 3。

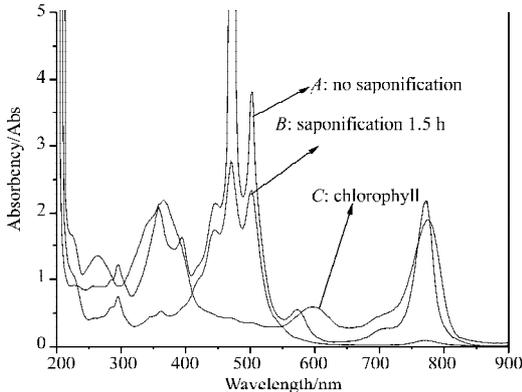


图 3 提取液光谱图

Fig. 3 Spectrum absorbency of extraction solution

图 3 中曲线 A 是皂化前的光谱扫描图, 曲线 B 是皂化 1.5 h 的光谱扫描图, 曲线 C 是乙醇浸泡液的光谱扫描图。从曲线 A 可以看出, 皂化前的类胡萝卜素提取液在 760 nm、570 nm、360 nm 处有吸收峰, 这与曲线 C 中的图形相同, 表明提取液中还含有细菌叶绿素, 说明乙醇浸泡菌泥未能完全去除细菌叶绿素, 还需要皂化。

从曲线 B 可以看出, 类胡萝卜素提取液皂化 1.5 h 后在 560 nm 处的吸收峰已经消失, 760 nm 和 360 nm 处的吸收峰变得很微弱, 几乎没有, 这说明皂化接近完全, 细菌叶绿素已完全被破坏。

另外, 类胡萝卜素酯水解前后的变化用在光谱图中不能反映出来。所以, 本试验又通过 HPLC 色谱图来观测是否发生水解。图 4 为类胡萝卜素的乙醚提取物皂化前的 HPLC 图谱, 图 5 为类胡萝卜素的乙醚提取物皂化后的 HPLC 图谱。通过对图 4 和图 5 的比较, 可以观察到: 皂化前的类胡萝卜素提取液保留时间较长, 而皂化后的类胡萝卜素提取液保留时间变短, 这说明类胡萝卜素酯已被水解为类胡萝卜素单体。因为类胡萝卜素水解后会生成类胡萝卜素醇和类胡萝卜素酸盐, 使提取液极性增加, 导致色谱行为发生变化^[7]。所以, 皂化能够除去类胡萝卜素中的叶绿素并水解类胡萝卜素酯, 从而提高产物的纯度。

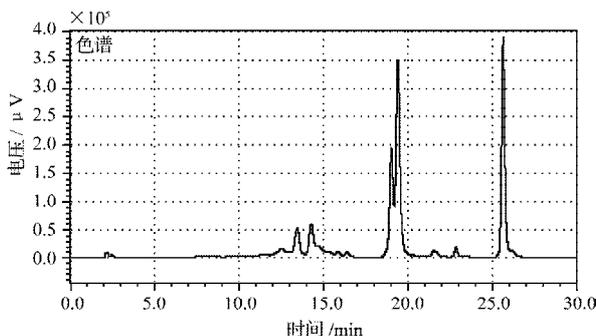


图 4 类胡萝卜素的乙醚提取物皂化前的 HPLC 图谱

Fig. 4 HPLC of carotenoid extraction with ethanol before saponification

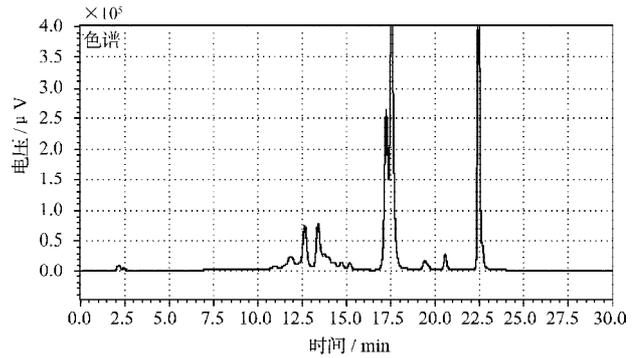


图 5 类胡萝卜素的乙醚提取物皂化后的 HPLC 图谱

Fig. 5 HPLC of carotenoid extraction with ethanol after saponification

3 结论

影响类胡萝卜素提取的因素有溶剂用量、提取温度、提取时间, 在使用丙酮为初提溶剂时, 在温度 49 °C 下提取 4 h, 丙酮溶剂用量为 5 mL/g 菌泥时效果最好。通过对皂化前后的光谱行为和色谱行为的对比分析, 认为皂化能除去提取液中残留的叶绿素, 并水解了类胡萝卜素酯。

参考文献:

- [1] 杜近义, 秦际威. 光合细菌的开发应用进展[J]. 微生物学通报, 1998, 33(11): 15-18.
- [2] Levy J, Bosin E, Feldman B, et al. Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer proliferation than either alpha-carotene or beta-carotene Nutr[J]. Cancer, 1995, 24: 257-266.
- [3] 吴向华, 杨启银, 刘五星. 光合细菌的研究进展及其应用[J]. 中国农业科技导报, 2004, 6(2): 35-38.
- [4] 惠伯康. 类胡萝卜素化学及生物化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 1-10.
- [5] 韩雅珊. 食品化学实验指导[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1992: 119-120.
- [6] Rodriguez-Amaya D B, Kimura M, Godoy HT, Arima HK. Assessment of provitamin A determination by open column chromatography/visible absorption spectrophotometry[J]. J Chromatogr Sxi, 1988, 26: 624-629.
- [7] Rodriguez-Amaya D B, Kimura M. Harvestplus Handbook for Carotenoid Analysis[M]. HarvestPlus Technical Monograph 2. Washington, DC and Cali: International Food Policy Research Institute (IFPRI) and International Center for Tropical Agriculture (CIAT), 2004: 10-11.