

三孢布拉氏霉中 β -胡萝卜素的提取研究

余茜炜, 向梦雄, 左乐, 蔡俊, 王常高*

(湖北工业大学发酵工程教育部重点实验室, 工业发酵湖北省协同创新中心, 湖北武汉 430068)

摘要 [目的] 确定从三孢布拉氏霉干菌体中提取 β -胡萝卜素的溶剂种类及提取条件。[方法] 以发酵所得的三孢布拉氏霉干菌丝体为原料, 通过单因素试验考察了不同溶剂种类、料液比、提取时间和提取温度对 β -胡萝卜素提取得率的影响。[结果] 试验得出, 乙醇提取得率较低, 而丙酮、石油醚、乙酸乙酯和正己烷 4 种溶剂从三孢布拉氏霉干菌体中提取 β -胡萝卜素的得率几乎相同。从价格因素考虑, 选取石油醚作为提取溶剂。适宜的提取条件为料液比 1:15 g/ml, 提取时间 2 h, 提取温度 40 $^{\circ}\text{C}$, 提取得率可达约 16 mg β -胡萝卜素/g 干菌体。[结论] 该研究可为利用三孢布拉氏霉发酵法生产天然 β -胡萝卜素提供依据和参考。

关键词 β -胡萝卜素; 三孢布拉氏霉; 提取

中图分类号 S509.9; Q939.97 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)02-00587-02

Study on Extraction of β -carotene from *Blakeslea trispora*

YU Xi-wei et al (Key Laboratory of Fermentation Engineering (Ministry of Education), Hubei Provincial Cooperative Innovation Center of Industrial Fermentation, Hubei University of Technology, Wuhan, Hubei 430068)

Abstract [Objective] To determine the extraction solvent and condition of β -carotene from *Blakeslea trispora* dry mycelium. [Method] *Blakeslea trispora* dry mycelium by fermentation was used as the material. The effects of solvent types, solid-liquid ratio, extraction time and extraction temperature on the yield of β -carotene were studied by single factor test. [Result] The extraction yield by ethanol is very low, but the yields by acetone, petroleum ether, ethyl acetate and n-hexane are almost the same. Petroleum ether was used as the final extraction solvent just because of its low cost. The optimum extraction conditions are 1:15 g/ml of solid-liquid ratio, 2 hours of extraction time and 40 $^{\circ}\text{C}$ of extraction temperature. The yield of extraction was up to 16 mg β -carotene per 1g dry mycelium. [Conclusion] The study could provide the basis and reference for the production of natural β -carotene by *Blakeslea trispora* fermentation.

Key words β -carotene; *Blakeslea trispora*; Extraction

β -胡萝卜素是联合国粮农组织和世界卫生组织一致认定的 A 类营养色素, 不仅是人体内维生素 A 的重要来源, 且具有良好的抗氧化、抗肿瘤、抗衰老、增强免疫等功能, 在医药、食品着色及营养强化、日用化妆品及饲料添加剂等领域具有广阔的应用前景^[1]。目前, 市场上的 β -胡萝卜素产品主要有化学合成品和天然产品 2 种类型。天然 β -胡萝卜素因其功能性强、安全性好及生物利用度高等优点而日益受到人们的青睐^[2]。发酵法是目前生产天然 β -胡萝卜素的主要途径, 在可合成 β -胡萝卜素的微生物中, 三孢布拉氏霉无论是生物量(可达 50 g 干菌体/L), 还是菌体细胞中 β -胡萝卜素含量(可达菌体干重的 1%~5%) 都是最理想的, 已成为目前国内外研究和生产天然 β -胡萝卜素的主要菌种^[3]。

湖北工业大学发酵工程教育部重点实验室近年来一直致力于 β -胡萝卜素的发酵生产研究, 前期已完成发酵条件优化等方面的研究^[4]。由于 β -胡萝卜素是一种脂溶性很强的胞内产物, 因此如何将 β -胡萝卜素从三孢布拉氏霉菌丝体中提取出来并进行不同程度的分离纯化也是发酵法生产天然 β -胡萝卜素的关键技术问题。笔者主要对三孢布拉氏霉菌丝体中 β -胡萝卜素提取的溶剂种类及条件进行了初步的摸索研究, 以期为今后的工业化大规模生产提供一定的依据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料 供试菌丝体是湖北工业大学发酵工程教育重

基金项目 教育部 2012 大学生创新创业训练计划项目(201210500029); 湖北工业大学博士启动基金项目(BSDQ12045)。

作者简介 余茜炜(1991-), 女, 湖北恩施人, 本科生, 专业: 生物工程。
* 通讯作者, 副教授, 博士, 从事微生物代谢产物发酵及分离纯化研究。

收稿日期 2013-12-23

点实验室采用 100 L 发酵罐利用三孢布拉氏霉正、负菌株结合发酵培养所得。新鲜菌丝洗净后在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下真空干燥 24 h 得干菌丝体。干菌丝体采用气流式超微粉碎机粉碎得干菌粉。该试验研究均为同一罐发酵所得菌丝体。

试验所用的无水酒精、丙酮、氯仿、乙酸乙酯、正己烷和石油醚(60~90 $^{\circ}\text{C}$ 沸程) 均为分析纯。

1.2 β -胡萝卜素的提取及提取率计算 精确称取 0.1 g 的干菌粉, 加入一定体积的各种不同溶剂, 在不同的温度和时间下进行浸提, 然后离心(8 000 r/min, 5 min), 取上清液用浸提时所用的相应溶剂进行适当稀释, 测定其在波长 450 nm 下的吸光度, 根据标准曲线算出浸提稀释液中 β -胡萝卜素的浓度, 再根据稀释倍率, 浸提时所用溶剂的体积及干菌粉的质量计算出 β -胡萝卜素的提取得率。

提取得率 = nCV/m (mg β -胡萝卜素/g 干菌体)

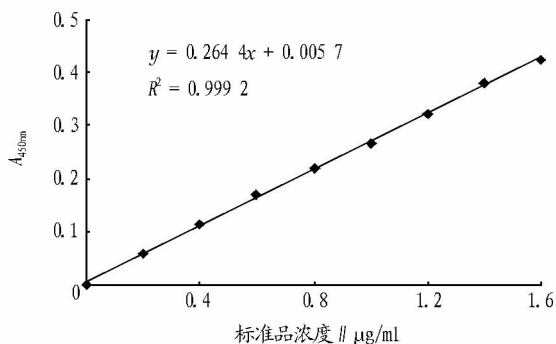
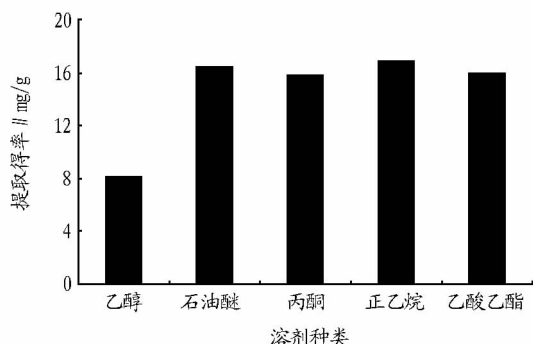
式中, n 为浸提液的稀释倍率; C 为浸提稀释液中 β -胡萝卜素的浓度; V 为浸提时所用溶剂的体积; m 为干菌粉的质量。

2 结果与分析

2.1 β -胡萝卜素标准曲线 精确称取 β -胡萝卜素标准品(Sigma 公司), 用 60~90 $^{\circ}\text{C}$ 沸程的石油醚溶解并稀释成一系列不同浓度, 分别测定其在波长 450 nm 下的吸光度。以 β -胡萝卜素的浓度为横坐标, 以各自的吸光度为纵坐标绘制标准曲线, 结果见图 1。

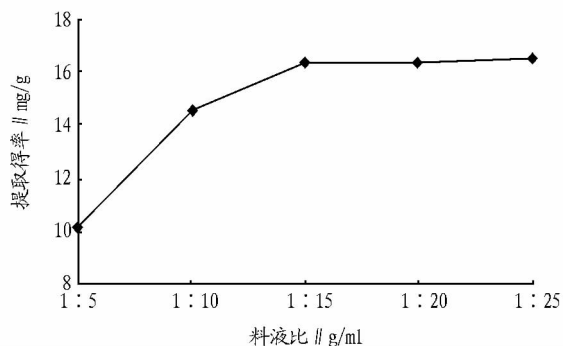
2.2 溶剂种类对 β -胡萝卜素提取得率的影响 精确称取干菌粉 0.1 g, 加入 1.5 ml 的不同溶剂, 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下浸提 2 h, 分别测定不同溶剂对 β -胡萝卜素的提取得率, 结果见图 2。

从图 2 可以看出, 乙醇的提取得率较低, 这可能与乙醇的极性较大而 β -胡萝卜素极性较弱有关。但石油醚、丙酮、

图1 β -胡萝卜素标准曲线图2 溶剂种类对 β -胡萝卜素提取得率的影响

正己烷和乙酸乙酯4种溶剂对 β -胡萝卜素的提取得率相差并不大,没有明显的差异。因此,理论上这4种溶剂均可用于三孢布拉氏霉干菌体中 β -胡萝卜素的提取。但实际生产中,除考虑提取得率之外,还要考虑溶剂的成本和安全性及溶剂的回收利用等因素。因此,后面的提取条件研究中,选择了价格相对便宜的石油醚作为提取溶剂。

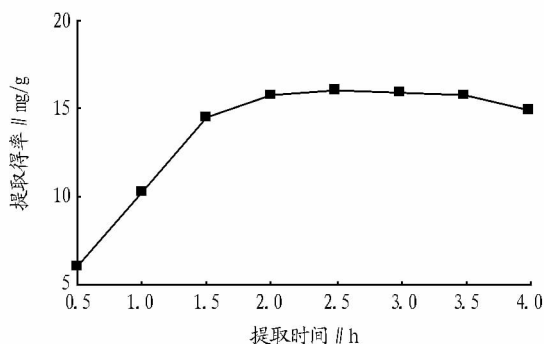
2.3 料液比对 β -胡萝卜素提取得率的影响 精确称取干菌粉0.1 g,分别按1:5、1:10、1:15、1:20和1:25 g/ml的料液比加入石油醚,在40℃下浸提2 h,分别测定在不同料液比下 β -胡萝卜素的提取得率,结果见图3。

图3 料液比对 β -胡萝卜素提取得率的影响

从图3可以看出,随着料液比的减小, β -胡萝卜素提取得率逐渐增加。当料液比达到1:15 g/ml时,提取得率达到最大值。料液比进一步减小,提取得率没有明显的增加,反而会使溶剂的用量增加,提取液浓度下降,增加溶剂回收的工作量和成本。因此,提取料液比达到1:15 g/ml即可。

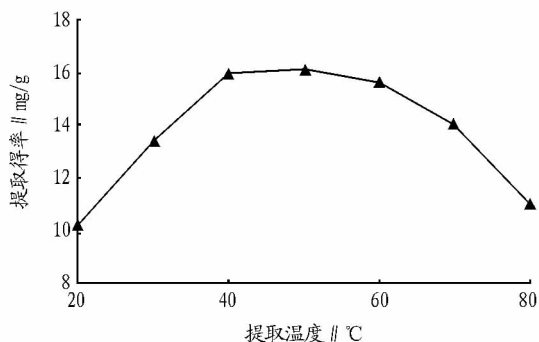
2.4 提取时间对 β -胡萝卜素提取得率的影响 精确称取干

菌粉0.1 g,按1:15 g/ml的料液比加入石油醚,在40℃下浸提不同时间,分别测定在不同浸提时间下 β -胡萝卜素的提取得率,结果见图4。

图4 提取时间对 β -胡萝卜素提取得率的影响

从图4可以看出,随着浸提时间的延长, β -胡萝卜素的提取得率逐渐增加。当浸提时间达到2 h时,提取得率达到最大值。浸提时间进一步延长,提取得率不再增加,反而有所下降,这可能是 β -胡萝卜素在光照下不稳定分解所致。因此,提取时间2 h即可。

2.5 提取温度对 β -胡萝卜素提取得率的影响 精确称取干菌粉0.1 g,按1:15 g/ml的料液比加入石油醚,在不同的水浴温度下浸提2 h,分别测定在不同浸提温度下 β -胡萝卜素的提取得率,结果见图5。

图5 提取温度对 β -胡萝卜素提取得率的影响

从图5可以看出,当温度较低时,随着温度的提高, β -胡萝卜素的提取得率逐渐增加。这可能是因为温度升高,分子扩散运动加快,有利于色素分子向溶剂中的溶解。但当温度超过40℃时,提取得率不再增加,反而有一个明显的下降,这可能是温度过高,加上光照的作用,加速了 β -胡萝卜素的氧化分解。因此,提取温度达到40℃即可,不宜过高。

3 讨论

目前,有大量文献报道了从各种不同的天然植物原料中提取类胡萝卜素的研究,所得出的最佳溶剂种类不尽相同,有丙酮、乙酸乙酯、石油醚或它们的混合溶剂^[5-7],但该试验研究结果却表明,丙酮、乙酸乙酯、石油醚和正己烷4种溶剂对三孢布拉氏霉干菌体中 β -胡萝卜素的提取得率相差并不大,没有明显的差异,这可能与不同的原料中胡萝卜素的分布及结合状态不同有关。陈鹏等报道了利用超声法从三孢布拉

(下转第622页)

大学生村官入职前的导师,对待聘大学生村官进行专业知识、专业技能、涉农相关知识的教育培训。这样大学生村官在入职前就能掌握部分工作技能,有利于大学生村官入职以后的工作开展。施行大学生村官导师制,可以密切师生关系,以便更好地贯彻全员育人、全过程育人、全方位育人的现代教育理念,更好地适应素质教育的要求和人才培养目标的转变。在师生之间建立导与学的关系,制定有针对性的个性化、差异化培养方案,因“材”施教,指导学生的思想、学习、生活,培养待聘大学生村官的工作适应性和对基层工作环境的认知,更加有利于培养扎根农村基层工作的大学生村官队伍。

2.4 实行大学生村官执业资格制度 随着我国社会主义市场经济的发展,有越来越多的农村人口外出务工,农村土地经营出现了集中的趋势。在我国不同地域的农村,一些农村专业生产合作社日渐繁盛,家庭农场亦崭露头角。这些现象预示农村土地的规模化经营势在必行,农村土地流转不可避免。农村土地规模化经营和农村专业生产合作社的出现,使得农业生产对专门人才的需求增加,对新型大学生村官的需求亦呈不断增长的态势。农村不断涌现的新动向,使得农民职业化成为可能。大学生村官作为新形势下的新农民的代表,可以率先实现职业化。以此为基础,可以实行大学生村官执业资格制度,参照目前国家职业标准设置大学生村官职业,并制定相应的职业等级、职业能力特征、基本要求、区域差异化要求、职业技能鉴定要求等。对有志于到农村基层工作的大学毕业生,可以参加大学生村官职业执业资格考试,取得大学生村官职业执业资格以后再参加大学生村官的招考^[4],变大学生村官选聘制度由“要我去”为“我要去”,可以有效地解决大学生村官到农村基层工作不稳定的问题,使得大学生村官工作的延续性得到有效保证,也有利于大学生村官到基层创业发展。

2.5 咨询“田教授”,请教“土专家” 做好大学生村官入职

后的继续培训教育,从实践中提高大学生村官的胜任力。大学生村官到任以后,为提高其工作适应性和工作能力,应该由所在地大学生村官管理机构指派工作导师,负责对大学生村官的日常工作能力的继续培养。农村事务的管理,需要的不仅仅是专业知识和专业技能,更需要农村工作经验。基层农民对大学生村官的要求是做给农民看,领着农民干,带着农民赚^[5],大学生村官要做好新农村建设的八大员^[6],要求大学生村官“站起来能说,坐下来能写,干起来能做”。为达到上述工作要求,大学生村官务必要多进农家门,多问农家事,虚心请教“田教授”、“农教授”、“土专家”,在实际工作中锻炼自己的能力,提高自己的水平,做一名真正合格的大学生村官。与此同时,大学生村官派出单位,也要安排相应的教师,密切联系派出的大学生村官,及时帮助他们解决实际工作困难,跟踪指导,以期进一步提高大学生村官的胜任力。

3 小结

大学生村官胜任力,不仅需要大学生村官具备坚实的专业基础和专业技术知识,更需要他们在具体工作中将专业知识转化成工作能力。只有不断学习,努力工作,扎根基层,乐于奉献,才能提升自己,提高农村基层工作的胜任力,为新农村建设做出应有的贡献。

参考文献

- [1] 李建华. 提高大学生村官工作能力之我见[J]. 中共银川市委党校学报, 2010, 12(5): 86-87.
- [2] 江苏省委组织部, 省委研究室课题组. 大学生“村官”工作长效机制探究——以江苏省为例[J]. 南京大学学报: 哲学·人文科学·社会科学版, 2010(3): 5-16.
- [3] 张丽. 从大学生村官新政策的实施看加强大学生能力建设[J]. 忻州师范学院学报, 2008, 24(5): 116-118.
- [4] 韩艳春. 依托胜任素质模型构建大学生村官职业标准[J]. 运城学院学报, 2012, 30(5): 89-92.
- [5] 齐燕. 当前大学生“村官”培训存在的问题及对策探讨[J]. 三门峡职业技术学院学报, 2013, 9(1): 21-23.
- [6] 王素玲, 邓安容, 尹丽平. 新农村建设基层管理人才培养模式的研究与实践[J]. 泸州职业技术学院学报, 2009(2): 16-20.

(上接第 588 页)

氏霉中提取 β -胡萝卜素的, 所得出的最佳溶剂是乙酸乙酯^[8], 这可能与菌株来源不同及发酵条件不同等有关。

6 号溶剂油(又称 6 号轻汽油)是目前国内浸出法生产植物色拉油的主要溶剂, 其使用技术的可靠性和安全性已得到广泛的认可。6 号溶剂油的主要成分是正己烷和环己烷的混合物, 其对三孢布拉氏霉干菌体中 β -胡萝卜素的提取得率应与前面 4 种溶剂相差无几。由于该溶剂使用量大, 供应充足, 价格也相应便宜, 因此在今后的大规模发酵生产中, 利用 6 号溶剂油从三孢布拉氏霉干菌体中提取 β -胡萝卜素也应是一个很好的选择。

该试验研究从三孢布拉氏霉干菌体中提取 β -胡萝卜素, 其提取得率比从其他天然动植物原料中的提取得率普遍要高很多, 尽管所使用的菌种还只是从中国典型培养物保藏中心购买的原始出发菌株。这也充分说明, 微生物发酵法依然是生产天然 β -胡萝卜素的理想方法, 相比天然原料提取法

而言, 具有产量高、不受环境因素影响、安全及成本低等优势。湖北工业大学发酵工程教育部重点实验室今后将对发酵菌株进行多轮诱变选育, 以进一步提高发酵产量, 降低成本, 从而为今后的工业化大规模生产奠定基础。

参考文献

- [1] 王雪. β -胡萝卜素的研究进展[J]. 中国化工贸易, 2013(5): 193.
- [2] 13 种食品着色剂国家标准初稿完成[J]. 中国酿造, 2010(11): 159.
- [3] 张婷婷, 葛佳, 牛天贵, 等. 三孢布拉氏霉菌发酵产 β -胡萝卜素发酵条件的研究[J]. 食品科技, 2009, 11(34): 2-7.
- [4] 颜作文, 王常高, 蔡俊. 三孢布拉氏霉菌产 β -胡萝卜素发酵条件的优化[J]. 食品与发酵科技, 2013, 49(2): 25-29.
- [5] 甄天元, 幕鸿雁. 橙皮中类胡萝卜素的提取工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(29): 14493-14495.
- [6] 赵永彬, 尹明安. 不同溶剂对胡萝卜中类胡萝卜素提取的影响[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(4): 671, 673.
- [7] 王敏, 祝渊静, 赵国良, 等. 天然胡萝卜素的提取及分离[J]. 重庆理工大学学报: 自然科学版, 2010, 24(3): 28-32.
- [8] 陈鹏, 王婧, 陈聪, 等. 超声法提取三孢布拉氏霉中的 β -胡萝卜素[J]. 大连工业大学学报, 2009, 28(6): 418-420.