

β-胡萝卜素发酵及提取工艺的研究

梁颖超^{1,2}, 金贞花^{1,2}, 张广昊^{1,2}, 关阳^{1,2}, 韩文静^{1,2}, 王金枝^{1,2}, 陶进^{1,2*}

(1. 玉米深加工国家工程研究中心, 吉林长春 130033; 2. 吉林中粮生化有限公司, 吉林长春 130033)

摘要 [目的]研究三孢布拉氏霉菌β-胡萝卜素发酵及其提取工艺的优化。[方法]利用三孢布拉氏霉菌发酵β-胡萝卜素,并通过分析发酵时间、干燥方法、保藏方式等因素对β-胡萝卜素含量的影响,确定β-胡萝卜素的制取工艺。[结果]试验得出,最适发酵时间为5 d,干燥方法为真空冷冻干燥机干燥法,保藏方法为下罐后较短时间内提取。按此工艺条件得到的β-胡萝卜素胞内含量为5.80%,发酵液中β-胡萝卜素含量可达到0.44 g/L。[结论]研究可为发酵法生产β-胡萝卜素及其提取工艺研究提供参考依据。

关键词 三孢布拉氏霉菌;β-胡萝卜素;发酵;提取

中图分类号 Q503 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)16-070-03

Fermentation and Extraction Process of β-carotene

LIANG Ying-chao^{1,2}, JIN Zhen-hua^{1,2}, ZHANG Guang-hao^{1,2}, TAO Jin^{1,2*} (1. The National Engineering Research Center of Corn Deep Processing, Changchun, Jilin 130033; 2. COFCO (Jilin) Bio-Chemical Co., Ltd., Changchun, Jilin 130033)

Abstract [Objective] To optimize the fermentation and extraction technology of β-carotene in *Blakeslea trispora*. [Method] β-carotene was fermented by *Blakeslea trispora*. Effects of fermentation time, drying method and storage method on β-carotene content were researched. The processing technology of β-carotene was determined. [Result] The optimal fermentation time was 5 d; the drying method was vacuum freeze drying; and the storage method was extracting as soon as possible after the fermentation. Under this condition, β-carotene contents in thalli and fermentation liquid were 5.80%; and 0.44 g/L, respectively. [Conclusion] This research provides references for the research and extraction of β-carotene by fermentation method.

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

β-胡萝卜素是类胡萝卜素之一,是一种橘黄色脂溶性化合物,是国际上公认的优秀天然色素,具有很强的抗氧化剂且为人体不可缺少的营养素^[1]。β-胡萝卜素因其着色功能,广泛应用在食品和化妆品领域,加有β-胡萝卜素的口红、胭脂等化妆品色泽丰满自然,食品中添加β-胡萝卜素色泽金灿灿诱人。β-胡萝卜素还具有较强的抗氧化性,其抗氧化性是维生素C的60倍、维生素E的10倍,可用于保护肌体免受氧自由基的毒害,具有抗癌、抗心血管病、抗白内障、抗老年性痴呆症等保健功能^[2]。β-胡萝卜素还是维生素A的前体,可作为药品和功能性添加剂,用于维生素A缺乏症、光敏症、皮肤粗糙等症状^[3]。

随着对β-胡萝卜素需求量的增加^[4],越来越多的人研究其制取工艺^[5-6]。常用的β-胡萝卜素制取技术主要有化学合成法、提取法、生物合成法(发酵法)等。化学合成法是通过化学反应人工合成β-胡萝卜素,产品为全反式结构;提取法则是从胡萝卜、枸杞、玉米等天然植物中直接提取β-胡萝卜素,生产效率低;而生物发酵法生产β-胡萝卜素不受环境等条件的限制,产量高且属于天然产品,天然β-胡萝卜素产品的立体异构比合成的全反式结构在体内更容易被吸收、生物活性更强,因此在医药、食品及保健领域有着很好的应用前景。

利用三孢布拉氏霉菌发酵制得天然β-胡萝卜素,因其成本较低、生产条件易实现、产量高等优点,被众多企业实现了工业化生产^[7]。三孢布拉氏霉菌发酵法得到的β-胡

萝卜素是胞内产物,因此要对发酵菌丝体进行收集,破碎菌体细胞以得到胞内产物。由于β-胡萝卜素是脂溶性,不溶于水,因此水分的存在将会影响提取效果,在β-胡萝卜素提取前要对菌丝体进行干燥,除去菌丝体中的水分,再用非极性有机溶剂进行提取。然而,天然β-胡萝卜素在干燥过程中极易被氧化,降低了其生物活性,限制了其在医药、食品及保健品领域的应用。因此,β-胡萝卜素干燥过程中找到一种低氧化率的干燥方式是非常重要的^[8]。笔者以三孢布拉氏霉菌发酵法制得的发酵液为原料,采用干燥箱干燥法和真空冷冻干燥机干燥法,分别得到含天然β-胡萝卜素的干菌体,最后利用紫外-分光光度计法进行β-胡萝卜素含量检测,确定最佳发酵时间、最适干燥方法和保藏方式对β-胡萝卜素含量的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料。β-胡萝卜素发酵液,实验室自制,三孢布拉氏霉菌发酵法制得。

1.1.2 主要试剂。β-胡萝卜素(标准品),阿拉丁试剂(上海)有限公司;石油醚(沸程30~60℃),天津市富宇精细化工有限公司。

1.1.3 主要仪器与设备。全温振荡培养箱(HZQ-F160型),哈尔滨东联电子技术有限公司;电热恒温培养箱(303A-5型),上海阳光实验仪器有限公司;真空冷冻干燥机(MAXI-DRY LYO型),法国Heto-holten;电热恒温鼓风干燥机(DHG-9070型),上海精宏实验设备有限公司;紫外分光光度计(8823B型),北京宾达英创科技有限公司;电子天平(AL204型),梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

基金项目 吉林省科技计划项目(20130305024NY)。

作者简介 梁颖超(1988-),女,黑龙江肇源人,助理工程师,硕士,从事玉米深加工研究。*通讯作者,博士,从事生物催化与生物化工研究。

收稿日期 2016-04-13

1.2 方法

1.2.1 菌丝体预处理。将三孢布拉氏霉菌(*Blakeslea trispora*)“+”、“-”菌株分别接种到 PDA 培养基上,在 28 °C 温度下培养 72 h。待菌株长出孢子后将菌落转接三角瓶发酵培养基中,在 28 °C 分别摇床培养 72 h 得到发酵液,其中培养基组分包括:玉米粉、葡萄糖、磷酸二氢钾、硫酸镁。将所得到的“+”菌发酵液取 10%,接入“-”菌发酵液中,在 28 °C 摇床培养 4~6 d。最终得到的发酵液采用滤网过滤,利用 5 L 自来水洗涤,得到含 β -胡萝卜素的三孢布拉氏霉菌菌丝体。

1.2.2 β -胡萝卜素标准曲线的绘制。精确称取 β -胡萝卜素标准品 50 mg,用分析纯的石油醚稀释定容至 50 mL,吸取定容后的溶液 1.0 mL 用石油醚继续稀释定容至 100 mL,此稀释液含 β -胡萝卜素 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$;分别吸取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mL 含 β -胡萝卜素 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的稀释液,用石油醚定容至 25 mL,此时 β -胡萝卜素标准溶液浓度梯度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$;然后以石油醚为空白对照,采用分光光度计测定 450 nm 波长处每个梯度标准溶液的吸光值;以标准品浓度为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制标准曲线 1。

1.2.3 β -胡萝卜素含量的测定。收集发酵液中的菌体,经干燥箱或真空冷冻干燥后得到干菌体;用研磨法粉碎细胞,然后过 60~80 目筛;准确称取菌体粉末 0.02 g,菌体粉末放入烧杯,加入石油醚玻璃棒搅拌,萃取直至菌体粉末无色为止;用滤纸过滤萃取后的上清液,滤液倒入 100 mL 容量瓶定容;取 1 mL 溶液,用石油醚定容至 25 mL;根据 β -胡萝卜素的特征吸收波长在 450 nm 条件下,用分光光度法测定吸光值,利用回归方程计算出 β -胡萝卜素含量。样品 β -胡萝卜素含量的计算公式如下:

$$\text{样品 } \beta\text{-胡萝卜素含量 (mg/g 干菌体)} = (C \times D \times V) / (1000 \times m)$$

式中, C 为由标准曲线查得或由回归方程算出的样品的溶液浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$); D 为色素萃取液的稀释倍数(25 倍); m 为萃取所用的干菌体样品质量(0.02 g); V 为萃取所用的石油醚体积(100 mL);1000 为将 β -胡萝卜素含量单位由 $\mu\text{g}/\text{g}$ 换算成 mg/g 。

$$\beta\text{-胡萝卜素的含量 (mg/L 发酵液)} = \text{菌体干重 (g/L)} \times \text{样品 } \beta\text{-胡萝卜素含量 (mg/g 干菌体)}$$

1.3 干菌体制备方法

1.3.1 烘箱干燥法制备。菌丝体预处理过程,同“1.2.1”。将洗涤好的含 β -胡萝卜素的三孢布拉氏霉菌菌丝体放入 40 °C 烘箱烘干 4 h,直至菌丝体恒重,将干燥好的菌丝体取出,用研钵研磨粉碎细胞,然后过 60 目筛,得到烘箱干燥法干燥含 β -胡萝卜素的三孢布拉氏霉菌粉。

1.3.2 真空冷冻干燥法制备。菌丝体预处理过程,同“1.2.1”。将洗涤好的含 β -胡萝卜素的三孢布拉氏霉菌菌丝体预冻,再利用真空冷冻干燥机干燥 4 h,直至菌丝体恒

重,将干燥好的菌丝体取出,用研钵研磨粉碎细胞,然后过 60 目筛,得到真空冷冻干燥机法干燥含 β -胡萝卜素的三孢布拉氏霉菌粉。

2 结果与分析

2.1 β -胡萝卜素标准曲线 通过检测不同浓度的 β -胡萝卜素标准品吸光度,绘制了其标准曲线,如图 1。 β -胡萝卜素标准曲线回归方程为: $y = 0.1187x - 0.0017$, $R^2 = 0.9975$,线性区间为 0~1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$,其中 x ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 为标准品浓度, y 为波长 450 nm 处吸光度。

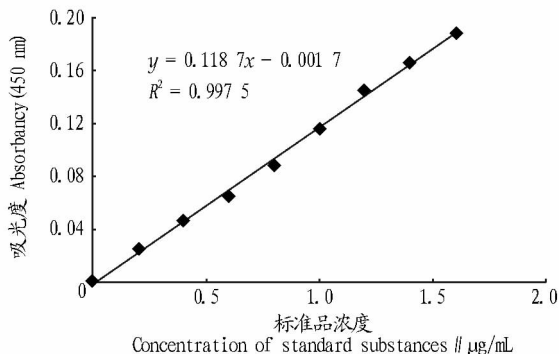


图 1 β -胡萝卜素标准曲线

Fig. 1 The standard curve of β -carotene

2.2 发酵时间对 β -胡萝卜素得率的影响 微生物的生长经历调整期、生长期、稳定期和衰亡期,因此发酵时间对菌体生长和代谢产物的产量影响比较大,为了积累更多的 β -胡萝卜素,需要确定最佳发酵时间。图 2 表示菌体干重和菌体中的 β -胡萝卜素含量随时间的变化,从图 2 可以看出,两者均在发酵第 5 天时最高,其值分别为 6.7 g/L 和 58.127 mg/g (冻干机干燥法检测结果)。这说明发酵第 5 天时,三孢布拉氏霉菌的生长处于稳定期,菌体数量积累最多;同时,细胞内合成 β -胡萝卜素的酶系已完全形成,因此积累了大量的 β -胡萝卜素。从图 3 可以看出,发酵液中 β -胡萝卜素含量的最高值也出现在发酵第 5 天,即 0.44 g/L。唐玲在文献中报道,三孢布拉氏霉菌在第 5 天进入细胞生长稳定期^[9],这与该试验中得到的结论一致。因此选择 5 d 为最适发酵周期,后续试验均采用发酵 5 d 的发酵液。

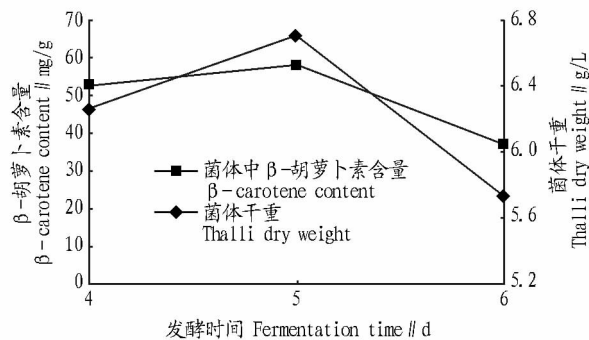


图 2 发酵时间对菌体中 β -胡萝卜素含量和菌体干重的影响

Fig. 2 Effects of fermentation time on thalli β -carotene content and thalli dry weight

2.3 不同干燥法对 β -胡萝卜素含量的影响 天然 β -胡

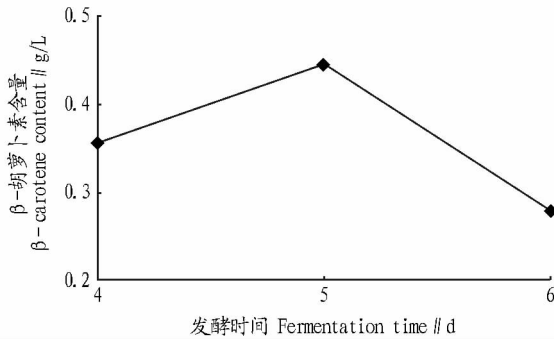


图3 发酵时间对发酵液中β-胡萝卜素含量的影响

Fig.3 Effects of fermentation time on β-carotene content in fermentation liquid

胡萝卜素在干燥过程中很容易被氧化,降低其生物活性,因此在β-胡萝卜素干燥过程中找到一种低氧化率的干燥方式非常重要。常用的菌体干燥法有:干燥箱干燥法和真空冷冻干燥法,前者应用最广泛,操作方便、设备简单;后者因其干燥过程不经过水分的液态转化而直接升华,能保持物理性质和化学组成,但生产成本较高。该试验以三孢布拉氏霉菌菌丝为原料,采用此2种干燥法分别制得干菌体,比较了这2种干燥法对β-胡萝卜素含量的影响,结果见图4。

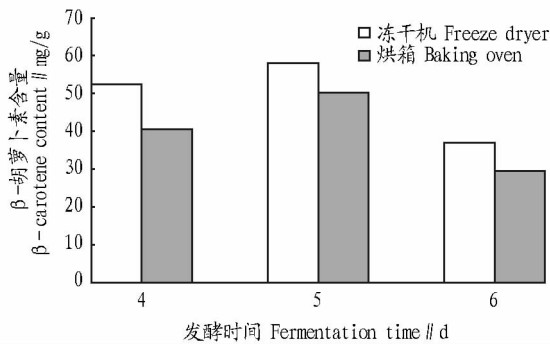


图4 不同干燥方式对菌体中β-胡萝卜素含量的影响

Fig.4 Effects of different drying methods on β-carotene content in thalli

从图4可以看出,使用真空冷冻干燥机干燥制得的干菌体中的β-胡萝卜素含量明显高于烘箱干燥制得的干菌体中的β-胡萝卜素含量。图5是β-胡萝卜素的分子结构式,可以看出β-胡萝卜素分子具有多双键结构,对光、热、氧等因素都很敏感,很容易氧化分解和异构化^[10-11]。因此,β-胡萝卜素在低温真空条件下稳定性更好,在较高温度(40℃)和空气接触环境中更容易被氧化。考虑到β-胡萝卜素是一种高附加值的产品,降低β-胡萝卜素的氧化降解率对收益率的提高影响较大,在菌体干燥工艺中应选择真空冷冻干燥法干燥菌体。

2.4 保藏方式对β-胡萝卜素降解的影响 由于β-胡萝卜素分子中含有很多共轭双键,化学性质不稳定,很容易被氧化降解,保藏方式对β-胡萝卜素的降解有很大的影响。首先,图6中比较了未经保藏的β-胡萝卜素和经过20h避光10℃保藏(分别稀释2500倍低浓度保藏和稀释100倍高

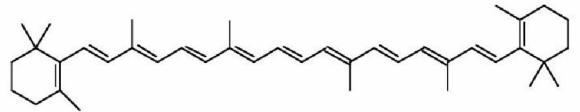


图5 β-胡萝卜素的分子结构式

Fig.5 Molecular structure of β-carotene

浓度保藏)的β-胡萝卜素干粉中β-胡萝卜素含量。从图6可以看出,菌体中β-胡萝卜素和发酵液中的β-胡萝卜素经过20h的保藏,其含量均有明显下降。从图6中还可以看出,低浓度(石油醚稀释2500倍)保藏的β-胡萝卜素溶液中的β-胡萝卜素残留比高浓度(石油醚稀释100倍)保藏的更多。这是因为低浓度时溶液中β-胡萝卜素物质的量少,底物与氧气接触的概率要小很多,导致β-胡萝卜素降解率下降。

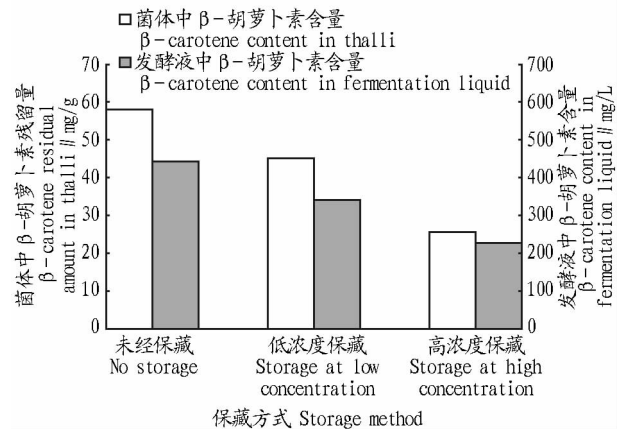


图6 不同保藏方式对β-胡萝卜素降解的影响

Fig.6 Effects of different storage methods on β-carotene degradation

因此,β-胡萝卜素发酵液的干燥和干粉的提纯工艺都应在下罐之后较短的时间内完成,这样才能降低β-胡萝卜素的氧化降解。在β-胡萝卜素后处理过程中如需保藏,应在低浓度条件下保藏,从而降低其损失。

3 结论

综上所述,利用三孢布拉氏霉菌发酵制备β-胡萝卜素5d为最适发酵周期;在菌体干燥工艺中选择真空冷冻干燥法干燥菌体;β-胡萝卜素发酵液的干燥和干粉的提纯工艺都应在下罐之后较短的时间内完成为宜;低浓度保藏方式有利于降低β-胡萝卜素的降解率。在此条件下制得的β-胡萝卜素胞内含量为5.80%,发酵液中β-胡萝卜素含量可达0.44g/L。

该研究中得出最佳发酵时间、最适干燥法和最适保藏方式,最大限度地降低了制取过程中β-胡萝卜素的氧化降解损失,可为利用三孢布拉氏霉菌发酵法制取β-胡萝卜素工艺提供参考依据。

参考文献

[1] 上海第六制药厂. 食品添加剂β-胡萝卜素:GB8821—1988[S]. 北京: 中国标准出版社,1988

(下转第105页)

氢呋喃的截留率较高(28.59%),说明膜的平均截留分子量较高,有效成分损失较少。

2.4.2 不同型号超滤膜对超滤效果的影响。选取截留相对分子量为 2、5、6、10 kD 的超滤膜,对所提取的苜蓿提取物 3,4-二香草基四氢呋喃粗品进行多次进料,在压力 0.2 MPa、膜面积 0.4 m²、料液温度 25 ℃、进液体积 50 L 的条件下,对苜蓿提取物 3,4-二香草基四氢呋喃粗品进行超滤纯化。由表 4 可知,6 kD 的超滤膜超滤效果较好,产品中 3,4-二香草基四氢呋喃的含量较高。

表 3 不同压力对超滤效果的影响

Table 3 Effects of different pressure on ultrafiltration effect

压力 Pressure MPa	平均膜通透量 Average membrane permeability // L/(m ² · s)	3,4-二香草基四氢呋喃截留率 3,4 - two vanillyl tetrahydrofuran retention rate // %
0.2	0.159	28.59
0.4	0.197	13.19
0.6	0.214	21.17

表 4 不同型号超滤膜对超滤效果的影响

Table 4 Effect of different types of ultrafiltration membrane on the ultrafiltration

截留相对分子 量 Interception relative molecular weight // kD	平均膜通透量 Average membrane permeability L/(m ² · s)	3,4-二香草基四氢呋喃含量 3,4 - two vanillyl tetrahydrofuran content // %
2	0.214	18.5
5	0.256	45.8
6	0.343	84.6
10	0.340	69.2

2.4.3 不同工艺对比。将大孔吸附树脂与超滤膜偶联技术工艺与传统工艺进行比较,结果表明,传统工艺方法能耗高,有效成分损失大;另外,传统工艺方法无法对 3,4-二香草基四氢呋喃进行选择性地分离提纯,产品保留率低,溶解性能差(表 5)。

3 结论

该研究中苜蓿全草经高压提取,X-5 大孔吸附树脂分

表 5 新工艺与传统工艺的对比

Table 5 Comparison of new technique and traditional technique

工艺 Technique	有效成分 保留率 Retention rate of effective components // %	产品灰 分含量 Ash content in products %	3,4-二香 草基四氢呋 喃含量 Content %	溶解性 Solubility
传统方法 Traditional method	53.45	1~2	45.1	浑浊悬浮物
新型工艺 New technology	96.02	<1	85.3	充分溶解

离,超滤膜纯化以及反复重结晶后,3,4-二香草基四氢呋喃的含量可达 85.3%。膜分离技术作为一种高新技术,具有较好的分离效果,在不同行业中均有所涉及,如制药、海水淡化、现代农业等。该研究首次采用大孔吸附树脂与超滤膜偶联技术相结合的纯化方法,对野生苜蓿中 3,4-二香草基四氢呋喃进行高效提取,3,4-二香草基四氢呋喃含量明显升高(≥85%),且产品的活性以及溶解性也得到不同程度的改善。与传统的提取分离工艺相比,膜分离技术工艺具有膜分离技术的功耗较小、产率较高、无污染等特点,非常适合产业化批量生产规模的应用。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第 23 卷第二分册 [M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- [2] 岳俊三. 我国苜蓿科的药用植物资源[J]. 中草药, 1987, 18(7): 29-32.
- [3] 李明生. 漫话福建苜蓿科药用植物[J]. 福建中医药, 1993, 24(3): 42-43.
- [4] 冀保全, 冯宝民, 史丽颖, 等. 苜蓿根中化学成分的研究[J]. 中国药学杂志, 2009(18): 1372-1374.
- [5] 闫兴国, 冀保全, 周渊, 等. 三角叶苜蓿根的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(11): 880-882.
- [6] 王伟, 周渊, 唐玲, 等. 滇藏苜蓿根中化学成分分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(9): 711-713.
- [7] JIANG Y H. Study on optimization of technology for extracting alkaloid from lotus leaf[J]. J Zhejiang University (Agric. & Life Sci.), 2004, 30(5): 519-523.
- [8] 张海悦, 李茜. 大孔树脂吸附和分离狭叶苜蓿中有效成分的研究[J]. 中国酿造, 2012, 31(1): 84-87.

(上接第 72 页)

- [2] 杨宁. 发酵法生产 β-胡萝卜素的进展[J]. 食品研究与开发, 2004, 25(3): 19-21.
- [3] 潘鹏, 杨斯, 蔡俊. 三孢布拉霉产 β-胡萝卜素发酵条件的研究[J]. 食品与发酵科技, 2010, 46(4): 36-40.
- [4] 张婷婷, 葛佳, 牛天贵, 等. 三孢布拉霉产 β-胡萝卜素发酵条件的研究[J]. 食品科技, 2009, 34(11): 2-7.
- [5] 余茜炜, 向梦雄, 左乐, 等. 三孢布拉氏霉中 β-胡萝卜素的提取研究[J]. 安徽农业科学, 2014(2): 587-588, 622.
- [6] 梁明. 天然 β-胡萝卜素提取工艺研究进展[J]. 安徽农业科学, 2014(20): 6771-6773, 6782.

- [7] 童海宝, 蔡杨, 马海森, 等. 发酵法生产天然 β-胡萝卜素[J]. 精细与专用化学品, 2002(2): 15-16.
- [8] 朱秀灵, 车振明, 徐伟, 等. β-胡萝卜素的生理功能及其提取技术的研究进展[J]. 广州食品工业科技, 2002, 20(2): 158-161.
- [9] 唐玲. 三孢布拉氏霉菌发酵 β-胡萝卜素的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2009.
- [10] 孙庆杰, 丁霄霖. 番茄红素稳定性的初步研究[J]. 食品与发酵工业, 1998, 24(2): 47-49.
- [11] 惠军, 韩彬, 单艳丽. 番茄红素提取工艺及其稳定性初步研究[J]. 新疆农业科学, 2004, 41(4): 204-207.