

红曲色素的提取研究

石 鹤, 陈丹丹, 胡 雄
(湖北师范学院 生物系, 湖北 黄石 435002)

摘要: 研究红曲霉发酵液及菌体中色素的提取方法, 结果表明: 活性炭(粉状)吸附法、等电点共沉淀法能较好地提取发酵液中的色素; 用 60% 乙醇在 60℃ 下提取 60 分钟能较好地抽提干燥菌体中的色素。

关键词: 红曲霉; 色素; 提取

中图分类号: TS261.12 文献标识码: A 文章编号: 1009-2714(2004)04-0069-04

红曲及红曲色素在我国生产和使用已有 1000 多年历史。液态深层发酵是当今工业生产红曲色素的趋势。红曲霉所产生的红曲色素 70%~80% 存在于菌体内, 20%~30% 分泌到发酵液中^[1]。存在于发酵液中的色素即胞外色素多为水溶性色素, 菌体内的色素即胞内色素多为醇溶性色素。采用简单高效的提取方法将两部分色素提取出来是红曲色素工业生产上急待解决的问题之一。本文对于用活性炭(粉状)吸附法、等电点共沉淀法提取发酵液中的色素, 溶剂浸提法抽提菌体中的色素进行了试验, 并对提取工艺条件进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 红曲发酵液 红曲霉 As. 3. 782, 玉米粉 4%, 豆饼粉 2% 培养基, pH = 6.0, 28℃ 培养 72h 的发酵液。

1.1.2 溶剂 丙酮、乙酸、乙醇。

1.1.3 吸附、过滤材料 粉状活性炭、粒状活性炭、尼龙布(100 目)。

1.2 方法

1.2.1 发酵液与菌体的分离 用 100 目尼龙布过滤, 收集滤液与滤渣(菌体)。

1.2.2 菌体内红曲色素的提取 将湿菌体于 103℃ 干燥箱中烘 24h, 研磨成粉末, 称取若干份, 分别加入不同的有机溶剂, 置于水浴锅中于不同温度下浸提, 过滤, 将滤液浓缩干燥得红曲色素成品, 计算出提取率。确定最佳浸提溶剂、温度、时间等^[2]。

提取率 = 红曲色素成品质量(g) / 干燥菌体原料质量(g) × 100%

1.2.3 发酵液中红曲色素的提取(活性炭吸附法) 以粉末状、颗粒状活性炭为吸附剂, 通过实验比较它们对红曲色素的吸附效果。将发酵液用 100 目尼龙布过滤, 测定滤液 OD₅₁₀(A₀), 分别取发酵液各 50ml 装入若干个小烧杯中, 每个烧杯内加入 5g 已处理过的活性炭, 搅拌静置 60min, 过滤, 测定滤液的 OD₅₁₀(A₁), 然后将滤渣置入烧杯中, 加入 50mL 95% 的乙醇于水浴锅中在不同温度下洗脱, 并于不同时间测定洗脱液 OD₅₁₀(A₂), 确定最佳吸附剂、洗脱温度、时间等。

吸附率 = (A₀ - A₁) / A₀ × 100%

/ 收稿日期 / 2004-04-06

/ 作者简介 / 石 鹤(1958—), 男, 湖北黄石人, 高级实验师, 主要研究方向为微生物工程。

$$\text{洗脱率} = A_2 / (A_0 - A_1) \times 100\%$$

$$\text{色素回收率} = A_2 / A_0 \times 100\%$$

1.2.4 发酵液中红曲色素的提取(沉淀法) 将发酵液用 100 目尼龙布过滤,然后将滤液 pH 调至该蛋白质等电点附近,使色素吸附在蛋白质上一起沉淀,过滤、干燥,即得色素。分别测定沉淀前、后色价和体积可算出色素提取率。

$$\text{色素提取率} = (u_0 - u_1) / u_0 \times 100\%$$

其中: u_0 :沉淀前色素总量(色价 \times 体积); u_1 :沉淀后上清液色素总量(色价 \times 体积)。

1.2.5 色价的测定方法 提取液色价测定:取 0.2mL ~ 1 mL 提取液用 70 %乙醇定容至 100 mL,以 70 %乙醇作空白对照,在 510nm 下测吸光度,使吸光度值在 0.2 ~ 0.8 范围内,将测得的吸光度值乘以稀释倍数,即为提取液的总色价^[3]。

菌体色素色价测定:称取菌体 0.05g(精确到 0.002g)于 50 mL 烧杯中,用 70 %乙醇溶液溶解,然后移入 100 mL 容量瓶稀释至刻度,振摇 30min,静置,取 1.0 mL 该溶液,加 70 %乙醇溶液 9 mL 并混匀,用 70 %乙醇溶液作空白对照,在 510nm 处测吸光度,吸光度值乘以 1000,除以样品质量,即得到成品色价(u/g)。

2 试验结果与分析

2.1 菌体内红曲色素提取条件的研究

2.1.1 菌体干湿状况对色素提取的影响 在实验中发现,将过滤得到的湿菌体直接用有机溶剂浸提的效果不够理想。所得到的浸提液色素含量很低,且对浸提液进行浓缩时,因含水过多,有机溶剂蒸发慢。而将湿菌体于 103 干燥 24h,再将干燥菌体碾磨成粉末,浸提速度明显高于湿菌体,且浸提液色价也明显提高,进行浓缩时所需时间短、温度低,避免了因长时间浓缩而使红曲色素发生部分聚合反应,导致浓缩液结块产生沉淀而变性。因此将菌体烘干后进行色素提取效果较好。

2.1.2 不同提取剂对红曲色素提取效果的影响 称取干燥菌体 5 份,每份 3g,分别加入 60mL 蒸馏水、75 %乙醇、75 %丙酮、4 % 乙酸,分别在室温、40、60、80 水浴锅中浸提 1h,过滤得滤液,并分别用各自的溶剂定容至 60mL。再分别取 1mL 滤液稀释至 10mL,在分光光度计上于 510nm 波长处测定溶液(稀释 10 倍)的吸光度,记录结果如表 1,根据 OD₅₁₀的大小可比较各有机溶剂的浸提效果。

表 1 不同提取剂对红曲色素的提取效果

溶剂	水	乙醇(75 %)	丙酮(75 %)	乙酸(4 %)
OD ₅₁₀	0.105	0.254	0.267	0.058

从表 1 可看出,菌体内色素大多为醇溶性色素,乙醇和丙酮提取率较高,但从经济和毒性方面考虑,乙醇较为适宜,且易回收,便于色素的干燥浓缩。

2.1.3 提取剂(乙醇)浓度对红曲色素提取效果的影响 称取干燥菌体 4 份,每份 3g,置入小烧杯中,分别加入 40 %、60 %、75 %、95 %乙醇溶液各 60mL 置入 60 水浴锅中浸提 60min,取出各自浸提液,定容至 60mL,过滤,于 510nm 处测定滤液(稀释 10 倍)吸光度,将滤液蒸发浓缩,即得红曲色素成品,计算各自提取率,结果如表 2

表 2 乙醇浓度对红曲色素提取的影响

乙醇浓度/ %	40	60	75	95
OD ₅₁₀	0.350	0.500	0.465	0.271
提取率/ %	8.23	11.03	9.41	6.13

从表 2 可看出,60 %乙醇溶液对红曲色素的浸提能力最强,浸提液的吸光值最高,提取率最高。

2.1.4 浸提温度对红曲色素提取效果的影响 取干燥菌体 10 份,每份 3g,5 份一组,分别加入 60mL 60 %、75 %乙醇溶液。分别在 20、40、60、80、90 水浴锅中浸提 60min,过滤后定容至

60mL,测定 OD₅₁₀结果如图 1。由图 1 可知:随温度的升高,浸提液吸光值有所升高,但超过 60 浸提液吸光值反而降低,可能是色素在高温下有所降解。所以,提取温度控制在 60 左右为宜。

2.1.5 浸提时间对红曲色素提取效果的影响 称取干燥菌体 4 份,每份 3g,每 2 份分别加入 60%、75%乙醇,分别置于 40、60 水浴锅中浸提,于不同时间下测定浸提液 OD₅₁₀,记录如图 2。

从图 2 可知:在 60min 以内,随时间延长,菌体内色素逐渐浸提出来,但 60min 以后,浸提液吸光度变化不大,甚至有下降的趋势,估计色素有所降解,故浸提时间以 60min 为宜。

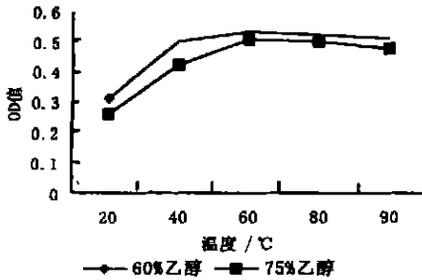


图 1 浸提温度对红曲色素提取的影响

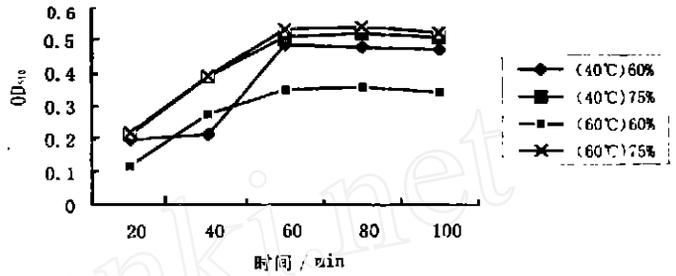


图 2 浸提时间对红曲色素提取的影响

2.1.6 钠盐、钙盐的影响 用乙醇对菌体内色素浸提时,加入一定量的钠盐或钙盐或同时添加这两种盐,均可提高浸提效果。其机理目前尚不清楚,可能是这些金属离子对细胞膜的通透性有影响。

2.2 发酵液中红曲色素提取条件的研究

2.2.1 两种活性炭对发酵液中色素的吸附效果

表 3 两种活性炭对发酵液中色素的吸附效果

吸附剂	发酵原液 OD ₅₁₀	吸附后发酵液 OD ₅₁₀	吸附率/ %	洗脱液 OD ₅₁₀	洗脱率/ %	色素回收率/ %
粒状活性炭	0.338	0.071	78.9	0.107	40	31.7
粉状活性炭	0.338	0.030	91.1	0.133	43.1	39.3

从表 3 可知,粉状活性炭吸附效果好。两种活性炭都不易洗脱,色素回收率较低。但粉状较粒状效果较好,故选用粉状活性炭。今后在粉状活性炭的洗脱方面须进一步研究。

2.2.2 洗脱时间、洗脱温度对洗脱率的影响 将吸附有红曲色素的活性炭在水浴锅中以不同温度用 95%乙醇洗脱,每隔一定时间测定洗脱液 OD₅₁₀,记录结果于表 4。

表 4 洗脱时间、洗脱温度对洗脱液吸光度的影响

时间/ min	15	30	45	60	
温 度	20	0.050	0.060	0.067	0.064
	40	0.070	0.080	0.083	0.086
	50	0.102	0.122	0.124	0.126
	60	0.103	0.122	0.127	0.131

由表 4 中数据可看出,红曲色素的洗脱率随温度的升高而增加,但过高会引起红曲色素降解,洗脱温度以 50 ~ 60 为宜。且当温度为 50 时洗脱率已较高。

在洗脱初始阶段,色素洗脱速度较快,但洗脱到 30min 以后,能洗脱的色素已基本洗脱,洗脱时间再延长对洗脱率影响不大,故洗脱温度为 50、洗脱时间为 30min 较好。

2.2.3 pH 对发酵液色素提取率的影响 发酵液中存在的水溶性色素可与培养基中的豆蛋白结合在一起,利用蛋白质等电点沉淀法,可使色素与蛋白质共沉淀^[4]。调节发酵液的 pH 值至豆蛋白的等电点处,使色素与豆蛋白一起沉淀下来,然后将发酵液离心沉淀,再干燥浓缩即可得到水溶性红曲色素。

不同 pH 的沉淀效果不同,试验结果如表 5。

表 5 pH 对发酵液色素提取率的影响

	1	2	3	4	5
pH	2.9	3.1	3.3	3.5	3.7
上清液浊度	略浑	清	清	清	略浑
色素提取率/ %	65	72	76	75	68

表 5 结果表明:pH 在 3.1~3.5 范围内沉淀效果较好,色素提取率也较高。

3 讨论

3.1 发酵液经过滤得到的菌体宜在 103℃ 烘干后研磨成粉末,其胞内色素用 60%乙醇于 60℃ 水浴锅中浸提,提取时间为 60min。

3.2 发酵液中的色素即胞外色素用粉末状活性炭于室温下吸附,后用 95%乙醇于 50℃ 水浴锅中洗脱 30min 左右。

3.3 菌体内的色素一次提取只能把部分色素提取出来,故可以进行第二次或第三次提取,而对发酵液中的色素提取时所得到的洗脱液因色价不高,故可以作为菌体第二次或第三次提取的提取剂。

3.4 通过本实验中的方法提取出来的红曲色素多为醇溶性色素,但水溶性色素更便于食品工业中的应用。故如何提高红曲色素中水溶性色素的比例是红曲色素生产中需解决的问题。

参考文献:

- [1] 童群义,高孔荣.红曲色素的提取工艺的研究[J].食品工业科技,1998,(2):27~29.
- [2] 张继民,阮怀贵.红曲色素提取工艺[J].安徽机电学院学报,1998,(4):55~59
- [3] 陈运中.红曲色素提取条件的实验研究[J].武汉工业学报,2001(3):19~21.
- [4] 陈国珍,石鹤,占玉珍,等.红曲霉液体发酵和红色素提取的研究[J].调味副食品科技,1982,(3):17~19.

Study on the extraction of monascus pigment

SHI He, CHEN Dan-dan, HU Xiong

(Department of Biology, Hubei Normal University, Huangshi 435002)

Abstract: The extract ways of Monascus pigment were studied. The result indicated that the optimum extraction process of the mycelium intercellular pigment were: extracted 60min at 60℃ with 60% alcohol, the optimum extraction ways of pigment in culture fluid were active-carbon absorb way and isoelectric fractionation.

Key words: monascus; pigment; extract