

胶红酵母虾青素纯品提取及分离纯化方法优化

黄开森, 廖志赢, 徐春厚*, 谢为天

广东海洋大学农学院, 湛江 524088

摘要:以胶红酵母 ZTHY2 作为提取虾青素的出发菌株, 通过对其破壁方法、浸提溶剂、皂化方法及提取条件的优化, 筛选出胶红酵母虾青素纯品的提取方法。用酸热法、冻融超声波裂解法与二甲基亚砜无水乙醇法等法处理干菌体细胞, 用 KOH 结合甲醇 A、甲醇 B 与乙醇法分别对虾青素粗提液进行皂化处理, 分别使用六种展开剂, 通过薄层层析鉴定游离的虾青素, 用 200 ~ 300 目硅胶对游离的虾青素进行柱层析, 获得其纯品, 最后用高效液相色谱仪测定虾青素纯品的含量。实验结果表明: 胶红酵母 ZTHY2 干菌体细胞的最佳破壁方法是酸热法, 浸提溶剂为乙酸乙酯 + 乙醇(2:1)溶液, 皂化液为 20 g/L KOH 的乙醇溶液, 皂化条件是 40 °C、30 min; 最佳展开剂和淋洗剂是正己烷 + 丙酮(5:2)溶液; 高效液相色谱仪测定的游离虾青素比率为 35%, 提取率为 96.8%。

关键词: 胶红酵母; 虾青素; 提取方法; 酸热法

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.11.002

Extraction, Separation and Purification Methods of Astaxanthin Pure Product from *Rhodotorula mucilaginosa*

HUANG Kai-sen, LIAO Zhi-ying, XU Chun-hou*, XIE Wei-tian

College of Agriculture, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China

Abstract: In order to screen out a method of extracting pure astaxanthin from *Rhodotorula mucilaginosa* through optimizing wall breaking method, extraction solvent, saponification method and extraction conditions, *Rhodotorula mucilaginosa* ZTHY2 was selected as the starting strains for astaxanthin extraction. Initially, dry bacterial cells were processed through acid heat method, freeze thawing ultrasonic cleavage method and dimethyl sulfoxide anhydrous ethanol method. Three saponification methods of astaxanthin crude extract, including methanol A method mixed with KOH, methanol B method mixed with KOH and ethanol mixed method with KOH, were adopted with six developing solvents separately. Subsequently, the free astaxanthin was identified by Thin-layer chromatography implemented by column chromatography with 200-300 mesh silica gel to obtain its purity. Ultimately, astaxanthin pure product was determined by High performance liquid chromatograph (HPLC). Results showed that the best breaking wall method of *Rhodotorula mucilaginosa* ZTHY2 dry cell is acid heat method, and the extraction solvent is a mixture of ethyl acetate and ethanol (2:1). Furthermore, the saponification solution is ethanol solution of 20 g/L potassium hydroxide and the saponification conditions is 40 °C, 30 min. The adopted spreading agent and eluent is a mixture of n-hexane and acetone (5:2). The free astaxanthin ratio determined by HPLC was 35%, and the extraction rate was 96.8%.

Key words: *Rhodotorula mucilaginosa*; astaxanthin; extraction method; acid thermal process

虾青素是一种普遍存在于自然界的天然类胡萝卜素, 具有抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、抗炎症、提高免疫力、呈色及促进生长等多种作用, 并能预防糖尿病、心血管和神经退行性疾病^[1-5]。该物质现已广泛应用于食品、保健品、药品、化妆品、饲料及养殖业等

行业^[6-9], 美国等国家已允许将其作为动物和鱼饲料中的食物色素使用^[3], 市场前景广阔。

目前, 天然虾青素的来源主要从水产品废弃物、雨生红球藻和红发夫酵母中提取^[10]。水产品废弃物中的虾青素含量低, 提取条件要求苛刻, 生产成本低, 产量少。雨生红球藻自养培养周期长, 技术水平要求较高, 生产工艺较复杂。红发夫酵母细胞内虾青素的生物合成受发酵条件的影响较大, 发酵成本较高, 提取产量较低。因此, 筛选出新的产虾青素菌

收稿日期: 2018-06-15 接受日期: 2018-09-27

基金项目: 广东省科技计划(2017A020217007); 广东省科技计划(2013B020307013); 湛江市科技计划(2015B01013)

* 通信作者 Tel: 86-759-2383292; E-mail: xuchunhou@sina.com

株,通过发酵工程及简单易行的虾青素纯品提取方法的研究与应用,可较好解决上述问题。本文所用胶红酵母 ZTHY2 从雷州半岛近岸海域分离获得,具有生长周期短、菌体细胞数量多、营养要求简单及虾青素含量高的优点,是一株理想的虾青素生产菌株。通过对其破壁方法、浸提溶剂、皂化方法及提取条件的优化研究,以期筛选出适宜于胶红酵母虾青素纯品的提取方法,为虾青素纯品的开发应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

胶红酵母 ZTHY2,由本校预防兽医学实验室分离鉴定,现保存于中国典型培养物保藏中心(保藏编号 CCTCC NO:M2015296)。

1.2 培养基

红酵母种子培养基 2% 蛋白胨、1% 酵母膏、2% 葡萄糖、2% NaCl、pH 值自然。

红酵母发酵培养基 2% 蛋白胨、2% 酵母膏、1% 牛肉膏、2% 葡萄糖、2% NaCl、0.025% $MnSO_4$ 、pH 值自然。

1.3 干菌体细胞制备

将胶红酵母 ZTHY2 斜面保存菌种接种于红酵母种子培养基,30 ℃、140 rpm 振荡培养 48 h,即为胶红酵母种子液;将种子液按 5% 接种于红酵母发酵培养基,30 ℃、140 rpm 振荡培养 72 h,即为胶红酵母发酵液;将发酵液于 4000 rpm 离心 20 min,弃上清液,用灭菌蒸馏水洗涤两次,将沉淀细胞于 50 ℃ 温箱中烘干至恒重,即为干菌体细胞。

1.4 虾青素粗提液的提取方法

1.4.1 酸热法

称取 0.1 g 干菌体细胞于离心管中,加入 3 mol/L 盐酸 5 mL,混匀,室温静置 40 min,沸水浴 3 min,迅速冷却,4000 rpm 离心 10 min,弃上清液,蒸馏水洗涤 2 次,加入 7 mL 浸提液,于 50 ℃ 水浴中提取 30 min,4000 rpm 离心 15 min,重复提取 2 次;将上清液置于 20 mL 刻度管中,分别用丙酮溶液、乙酸乙酯 + 乙醇(2:1)溶液和乙腈 + 甲醇(7.5:2.5)溶液作浸提液,作浸提处理后定容至 15 mL,即为虾青素粗提液,待测。

1.4.2 反复冻融 + 超声波裂解法

参照文献[11]中的方法,进行了改进。称取 0.1 g 干菌体细胞于离心管中,加入蒸馏水 2 mL,混匀,反复冻融(-30 ℃ 冻存,37 ℃ 溶解)3 次,再用超

声波进行裂解(超声波的频率 40 kHz,处理时间为 10 min,温度为室温),在裂解液中加入乙酸乙酯 7 mL,在 50 ℃ 水浴中提取 3 h,4000 rpm 离心 15 min,重复提取 2 次;将上清液置于 20 mL 刻度管中,用乙酸乙酯定容至 15 mL,即为虾青素粗提液,待测。

1.4.3 二甲基亚砜(DMSO) + 无水乙醇法

称取 0.1 g 干菌体细胞于离心管中,加入 5 mL 已预热 50 ℃ 的 DMSO,混匀,置于 50 ℃ 水浴锅中 5 min,取出离心管并加入 2 mL 无水乙醇,闭光静置提取 15 min,4000 rpm 离心 15 min,重复提取 2 次;将上清液置于 20 mL 刻度管中,用无水乙醇定容至 15 mL,即为虾青素粗提液,待测。

1.5 粗提液中虾青素含量的测定

用紫外可见分光光度计对虾青素标准品及虾青素粗提液进行扫描,确定 476 nm 为最大吸收波长,直接用吸光值(A_{476})的大小定性反映胶红酵母粗提液中虾青素含量的高低。

1.6 虾青素浓缩液的皂化方法

在避光条件下,将虾青素粗提液 15 mL 用真空旋转蒸发仪(温度为 35 ℃,真空度为 0.08 MPa)浓缩至 5 mL,即为虾青素浓缩液。

1.6.1 KOH + 甲醇 A 法

取 5 mL 虾青素浓缩液,置于离心管中,加入 10 g/L KOH 的甲醇溶液 3 mL,于 4 ℃ 黑暗条件下静置 7 h,10000 rpm、4 ℃ 离心 15 min,收集上清液,即为皂化后的虾青素提取液,进行薄层层析鉴定。

1.6.2 KOH + 甲醇 B 法

取 2.5 mL 虾青素浓缩液,置于刻度试管中,加入 10 g/L KOH 的甲醇溶液 2.5 mL,于 20 ℃ 黑暗条件下振荡 60 min;皂化后的溶液用甲醇定容至 10 mL,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液即为皂化后的虾青素提取液,进行薄层层析鉴定。

1.6.3 KOH + 乙醇法

取 5 mL 虾青素浓缩液,置于分液漏斗中,加入乙酸乙酯 5 mL 和 20 g/L KOH 的乙醇溶液 10 mL,于 40 ℃ 暗处静置 30 min,加入饱和 NaCl 溶液直至液体出现分相,再于 4 ℃ 冰箱中静置 3 h,收集上层有色的乙酸乙酯相,即为皂化后的虾青素提取液,进行薄层层析鉴定。

1.7 薄层层析鉴定及展开剂的选择

薄层层析所使用的展开剂分别是:正己烷 + 二氯甲烷 + 丙酮(5:2:2)溶液、正己烷 + 石油醚 + 乙酸乙酯(7:2:1)溶液、正己烷 + 石油醚 + 乙酸乙酯

(7:1:2)溶液、正己烷 + 丙酮(7:3)溶液、正己烷 + 丙酮(5:2)溶液、石油醚 + 丙酮(2:1)溶液和甲醇 + 乙腈(3:1)溶液等七种组合展开剂。

根据比移值、分离度和分离个数进行比较,从而选出最适合的展开剂。计算公式:比移值 = b/a ;分离度 = $2d/(W_1 + W_2)$;式中, a :原点到展开剂前沿的距离 (cm); b :原点到各类斑点中心的距离 (cm); d :相邻两斑点中心的距离差; W_1 、 W_2 :相邻两斑点的宽度。

1.8 柱层析分离虾青素

用湿法装柱,以正己烷为装柱溶剂,将硅胶(200~300目)装填到配有玻璃活塞的层析柱中。将皂化后的虾青素提取液滴加于层析柱硅胶表面,用薄层层析选择出的最佳展开剂为洗脱剂,收集不同的洗脱组分。

1.9 高效液相色谱法测定虾青素含量

用虾青素标准品绘制标准曲线,将柱层析获得

的洗脱组分用高效液相色谱(HPLC)测定虾青素的含量。

HPLC条件:Novapac18反向色谱柱(3.9 mm × 150 mm, 4 μm),进样量为 10 μL,流动相为:A液,甲醇-四氢呋喃-乙腈(53:36:11);B液,水。梯度洗脱条件:0~40 min,A液比例为 65%~100%;40~45 min,A液比例为 100%~65%;45~48 min,A液比例为 65%;流速为 1.0 mL/min,柱温为 35℃,检测波长为 475 nm。

2 结果与分析

2.1 虾青素提取方法的比较

胶红酵母虾青素提取方法的比较结果见表1。由表1可知,用乙酸乙酯 + 乙醇(2:1)溶液作为浸提液的酸热法提取的虾青素的吸光值最高,明显优于其他四种提取方法。

表1 胶红酵母虾青素提取方法的比较

Table 1 Comparison of extraction methods of astaxanthin from *R. mucilaginosa*

提取方法 浸提液 Extraction method Leaching liquor	酸热法丙酮 Acid thermal process Acetone	酸热法 乙酸乙酯 + 乙醇 Acid thermal process/Ethyl acetate + ethanol	酸热法 乙腈 + 甲醇 Acid thermal process/Acetonitrile + methanol	冻融 + 超声波裂解法 乙酸乙酯 Freeze-thaw + Ultrasonic cracking/Ethylacetate	DMSO + 无水乙醇法/乙醇 DMSO + Anhydrous ethanol/ethanol
吸光值 Absorbance(A476)	0.393	0.886	0.267	0.291	0.164

酸-热法破壁不仅仅成本低、速度快、简便易操作,而且其对海洋红酵母细胞壁的破碎也最为彻底^[12]。本试验先用酸热法进行破壁,再用乙酸乙酯和乙醇(2:1)混合液做有机溶剂进行提取,在分光光度计下的吸光值明显高于反复冻融 + 超声波裂解法、DMSO + 乙醇法及其它浸提溶剂,产量达 497.4233 μg/g,这与王岁楼等^[13]的研究结果基本一致,与周鲜娇等^[14]的研究结果不同,其所测结果是 DMSO 法高于酸热法。酸热法破壁虽然在一定程度上会破坏虾青素,但该方法破壁效果好,提取效率高,只要控制好条件,就能开发出一种安全、简便、提取效果好的破壁方法。

2.2 皂化方法的比较

用3种方法对虾青素浓缩液进行皂化,获取游离虾青素,通过薄层层析跑点反映皂化的优劣程度。展开剂为正己烷 + 石油醚 + 乙酸乙酯(7:1:2)溶液时,虾青素浓缩液的薄层层析图及等比例模式图见图1。

理想的比移值应该在 0.2~0.8 之间,由图1可知,比移值在 0.321 位置上,水解液的点明显加深、加大,为游离虾青素的跑点;而比移值在 0.769 位置上,水解液的点明显变浅、变小,且此点已接近比移值的最大值,判定此点为虾青素酯的跑点。3种皂化方法比较,KOH + 乙醇法所得到的游离虾青素最多,跑点最为明显,分离度也最高。

由于天然虾青素多以酯类的形式存在,而酯化形式的虾青素生物利用度较低,纯化和检测都较困难,故从胶红酵母中提取虾青素需要将粗提物中的虾青素酯皂化水解成游离虾青素。本试验用 20 g/L KOH 的乙醇溶液作为虾青素酯皂化液,在 40℃下皂化 30 min,得出的样品进行薄层层析鉴定相比于其它方法更优,经高效液相色谱检测的皂化得到的游离虾青素比率为 35%。碱的浓度、皂化温度、皂化时间均对皂化效果有着显著的影响,Chen 等^[15]探讨了室温和 5℃条件下的皂化效果,结果显示低温情况下更有利于减少虾青素在皂化过程中的破

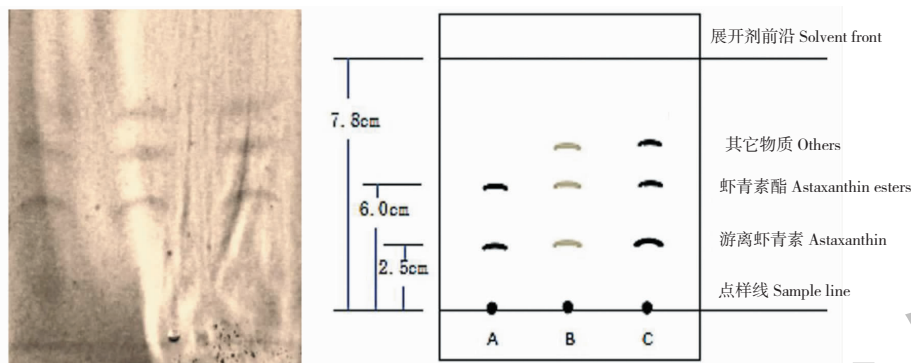


图1 虾青素浓缩液的薄层层析图及其模式图

Fig. 1 Map of thin-layer chromatography from concentrated astaxanthin and its constrain mode map

注:A:KOH + 甲醇 A 法;B:KOH + 甲醇 B 法;C:KOH + 乙醇法。

Note:A:potassium hydroxide + Ethanol A metod;B:Potassium hydroxide + Ethanol B metod;C:Potassium hydroxide + Ethanol C metod.

坏,但对于一个水解反应来说,温度高时反应快,而在赵丽艳等^[16]研究中也表明在 40 °C 下皂化 30 min 的效果最好。

2.3 展开剂的选择

薄层层析所用展开剂组合、展开时间、比移值及

分离度的结果见表 2。由表 2 可知,正己烷 + 石油醚 + 乙酸乙酯(7:2:1)溶液与正己烷 + 丙酮(5:2)溶液的分离度较大,而正己烷 + 丙酮溶液的比移值适中,展开时间也较为理想。

表 2 薄层层析展开剂的比较

Table 2 Comparison of developing solvents of thin-layer chromatography

展开剂 Developing solvent	展开时间 Developing time (min)	比移值 R_f value (cm)	分离度 Resolution
正己烷 + 二氯甲烷 + 丙酮(5:2:2) N-hexane + Dichloromethane + Acetone	16	0.41	3.2
正己烷 + 石油醚 + 乙酸乙酯(7:2:1) N-hexane + Petroleum ether + Ethyl acetate	10	0.56	6.6
正己烷 + 石油醚 + 乙酸乙酯(7:1:2) N-hexane + Petroleum ether + Ethyl acetate	9	0.40	3.5
正己烷 + 丙酮(7:3) N-hexane + Acetone	7	0.42	2.5
正己烷 + 丙酮(5:2) N-hexane + Acetone	7	0.43	5.8
石油醚 + 丙酮(2:1) Petroleum ether + Acetone	6.5	0.6	2.3
甲醇 + 乙腈(3:1) Methanol + Acetonitrile	∞		

本试验选用了正己烷、丙酮、石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、甲醇和乙腈等成分组成的 7 组混合液作为薄层层析的展开剂,表明正己烷和丙酮(5:2)混合液作为展开剂时的分离效果最好,层析板上分离出清晰的 4 个点。这与孙伟红等^[17]报道的在红发夫酵母虾青素分离纯化中所用的展开剂是正己烷-二氯甲烷-丙酮(5:2.5:1)溶液及郭建瑞等^[18]对红酵母 RY-4 中虾青素的分离纯化研究所筛选出的石油醚和乙酸乙酯(2:1)作为理想展开剂不同。至

于哪种有机溶剂及其组合作为展开剂效果更好,有待于反复多次的进一步试验。

2.4 HPLC 测定胶红酵母虾青素的含量

虾青素的标准曲线见图 2。由图 2 可知,虾青素在 1 ~ 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内线性关系良好,一次回归方程为 $y = 3.182x + 0.748$,相关系数 $R^2 = 0.992$ 。

虾青素标准品及虾青素提取液的洗脱组分的 HPLC 图谱见图 3 和图 4。由图 3 和图 4 可知,虾青

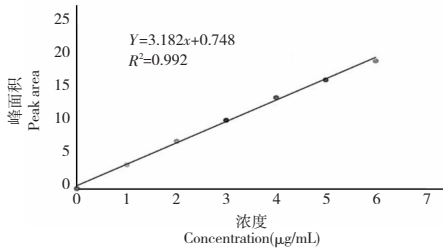


图2 虾青素标准曲线

Fig. 2 Standard curve of astaxanthin

素标准品和虾青素提取样品在本试验条件下的保留时间均为 12.013 min, 但提取样品在虾青素的峰值之后出现了两个极小的峰, 可推测为虾青素单酯及虾青素双酯; 通过 HPLC 测定出的峰面积结合虾青素的标准曲线一次性回归方程可得出虾青素提取样品中的游离虾青素浓度为 96.8%。

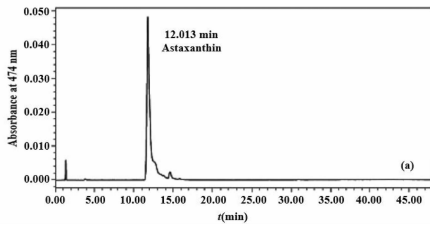


图3 虾青素标准品的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC map of astaxanthin standard substance

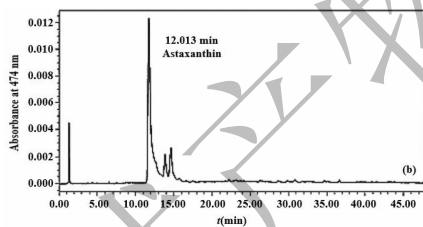


图4 虾青素提取样品的 HPLC 图谱

Fig. 4 HPLC map of astaxanthin extraction sample

3 结论

本文通过 3 种破壁方法、3 种浸提溶剂和 3 种皂化方法的比较试验, 筛选出适宜于胶红酵母 ZTHY2 虾青素提取和纯化的方法, 即用酸热法破坏菌体细胞壁, 用乙酸乙酯 + 乙醇 (2:1) 溶液为浸提溶剂, 用 20 g/L KOH 的乙醇溶液在 40 °C 皂化粗提液 30 min, 经 200 ~ 300 目硅胶柱层析, 获得虾青素纯品。本研究结果为利用海洋红酵母生产、提取和纯化虾青素提供了一种有效的方法及试验依据。

参考文献

- Rao AR, Phang SM, Sarada R. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—a review [J]. *Mar Drugs*, 2014, 12: 128-152.
- Hussein G, Sankawa U, Goto H, et al. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69: 443-449.
- Li Z, Wang H. Multiple mechanisms of anti-cancer effects exerted by astaxanthin [J]. *Mar Drugs*, 2015, 13: 4310-4330.
- Naguib YM. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids [J]. *J Agr Food Chem*, 2000, 48: 1150-1154.
- Yoshimi K, Hiroshi Y, Kazuo K. Potential anti-atherosclerotic properties of astaxanthin [J]. *Mar Drugs*, 2016, 14 (2): 35-47.
- Xiao CR (肖素荣), Li JD (李京东). Features of astaxanthin and its application prospects [J]. *Food and Nutr in China (中国食物与营养)*, 2011, 17(5): 33-35.
- Zhao L (赵樑), Wang XC (王锡昌), Wu XG (吴旭干). A review: effects of astaxanthin in feed on quality of aquatic animals [J]. *Fisheries Sci (水产科学)*, 2016, 35: 440-445.
- Tao SY (陶姝颖), Ming J (明建). Research advance on the functional characteristics of astaxanthin and its application in functional food [J]. *Food Ind (食品工业)*, 2012, 33: 111-115.
- Xu HY (徐海燕), Cao B (曹斌), Chen J (陈静), et al. Biological function of astaxanthin and its application [J]. *Feed China (饲料广角)*, 2012, 11: 23-25.
- Cai J (蔡俊), You ZN (游智能). Current status of fermentative production of astaxanthin [J]. *Food Sci (食品科学)*, 2015, 36: 358-364.
- Sun XJ (孙协军), Wu JT (武纪天), Li XX (李秀霞), et al. Effect of extracting method of ultrasound combined with repeated freezing and thawing method on astaxanthin extraction efficiency from shrimp shell [J]. *Packag Food Machinery (包装与食品机械)*, 2017, 35(5): 1-5.
- Zhao D (赵笛). *Rhodotorula benthica* culture condition optimization and study on increasing astaxanthin yield [D]. Dalian: Dalian Polytechnic University (大连工业大学), 2015.
- Wang SL (王岁楼), Zhang X (张鑫), Zhang PZ (张平之), et al. The extraction of carotenoids from *Rhodotorula* [J]. *Food Machinery (食品与机械)*, 2000, 6: 30-31.
- Zhou YJ (周鲜娇), Ma JL (马家丽), Wu XM (吴雪梅). Comparison of different methods of extraction of pigment from marine *Rhodotorula* [J]. *Sci Technol Food Ind (食品工业科技)*, 2009, 3: 284-286.