

文章编号 :1009-038X(2001)02-0169-04

法夫酵母色素的组成与性质

陈晓明¹, 徐学明², 金征宇²

(1. 淮阴工学院农业与食品工程系,江苏淮阴 223001;2. 无锡轻工大学食品学院,江苏无锡 214036)

摘 要:对法夫酵母色素的组成及其光谱特性和稳定性进行了研究.结果表明:法夫酵母色素是由 10 多种类胡萝卜素组成,其中虾青素为 78%,色素呈亮丽的红色,对热较敏感,对自然光、紫外光、氧很敏感,色拉油和抗氧化剂对其有一定的保护作用.

关键词:法夫酵母;色素;虾青素;稳定性

中图分类号:TS 202.3

文献标识码:A

Studies on the Composition and Characteristics of Pigments from *Phaffia rhodozyma*

CHEN Xiao-ming¹, XU Xue-ming², JIN Zheng-yu²

(1. Department of Agricultural and Food engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huaiyin 223001, China; 2. School of Food Science & Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036, China)

Abstract: The composition of pigments from *P. rhodozyma* was analyzed by TLC, photospectrum and HPLC. It was indicated that *P. rhodozyma* contained more than ten kinds of carotenoids, and 78% of total carotenoids were astaxanthin. Test results showed that the pigments were very sensitive to heat, light and oxygen. Using salad oil and adding antioxidants could reduce the loss.

Key words: *Phaffia rhodozyma*; pigment; astaxanthin; stability

法夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)是 20 世纪 70 年代由 Phaff 等人在日本及美国阿拉斯加山区上落叶树的渗出物中首先分离得到的一种新酵母属,迄今为止此属只有一种^[2].由于在野生法夫酵母所产的十几种类胡萝卜素中虾青素是最大的组分,占同类胡萝卜素的 40%~95%^[3],因而它被认为是最有可能实现工业化发酵生产虾青素的优良菌株^[4].

虾青素,即 3,3'-二羟基-4,4'-二酮基- β , β' -胡萝卜素,是一种非维生素 A 源的类胡萝卜素^[5].它不仅具有很强的抗氧化性^[6]、抗肿瘤及增强免疫的生理功能^[7,8],而且拥有艳丽的红色及极强的色素沉

积能力^[9,10],国外已成功用于高档水产养殖.虾青素作为功能性色素在食品、医药、化妆品及饲料等工业中具有广阔的应用前景^[11].

作者对实验室筛选获得的法夫酵母菌 WSS-FF6(作者所在实验室保藏号)所产的色素进行了分析研究,为今后进一步开发和利用提供一定的科学依据.

1 材料、仪器与试剂

1.1 法夫酵母

作者所在实验室保藏的法夫酵母菌 WSS-FF6,

收稿日期:2000-06-17;修订日期:2000-12-22.

作者简介:陈晓明(1969-),女,江苏淮阴人,食品工程硕士研究生,讲师.

万方数据

按文献 [12] 报道的方法培养后,离心收集菌体,蒸馏水洗涤 2 次,冷冻干燥后密封、避光贮存在 -20℃ 以下。

1.2 主要仪器

723 型可见分光光度计,上海分析仪器总厂生产;UV3000 紫外分光光度计,日本岛津公司生产;Waters 209 高压液相色谱仪,日本 Waters 公司生产。

1.3 试剂

虾青素标样,由 ROCHE 公司提供;石油醚(分析纯)、丙酮(分析纯)、氯仿(分析纯)、二甲亚砜(分析纯)、BHA(食品级)、BHT(食品级)、TBHQ(食品级)、硅胶 F254(60 型)、色拉油。

2 实验方法

2.1 总类胡萝卜素测定

二甲亚砜法 [13]。准确称取酵母粉 15 mg,用 1 mL 二甲亚砜破壁,加 5 mL 丙酮萃取,3 000 r/min 离心 5 min,上清液在 480 nm 波长下以二甲亚砜与丙酮混合液(体积比 1:5)为空白测定吸光度。

细胞总类胡萝卜素质量分数($\mu\text{g}/\text{mg}$)= $(A \times V)/(E \times W)$

式中 A 为吸光度, V 为萃取液体积数 6mL, E 为消光系数 0.16, W 为称取的酵母质量 mg。

2.2 虾青素含量测定

HPLC 法测定。以标样为基准,计算峰面积。色谱条件为 ZOBAX C18 色谱柱,流动相为乙腈:甲醇:水 = 70:25:5,进样量 5 μL ,体积流量 1 mL/min,波长为 480 nm。

2.3 色素的提取

称取一定量的干菌体预处理,用丙酮提取类胡萝卜素至菌体不褪色,提取液用石油醚萃取至无色,无水 Na_2SO_4 吸水干燥后,真空($<40^\circ\text{C}$)脱溶。

2.4 色素的分离

TLC 分离,硅胶 F_{254} 与 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液按质量浓度为 1:2.2 在研钵中调和均匀,10 cm $\times$ 20 cm 玻璃板上铺成厚度为 0.25 mm 的硅胶板,自然干燥后于 105℃ 活化 1 h。点样,置于丙酮:石油醚体积分数为 20:80 的饱和层析缸内,25℃ 下展开。

2.5 色素的性质研究

色素溶液在不同的热处理、光照、溶剂、包装及抗氧化剂添加情况下,定时取样测定法夫酵母色素吸光度,计算色素残存率。

3 结果与讨论

3.1 吸收峰试验

取一定量法夫酵母色素,用丙酮配制色素溶液,用 UV300 紫外分光光度计在 300~600 nm 光区扫描,结果见图 1。

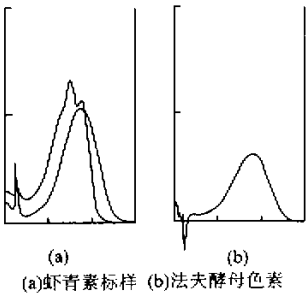


图 1 紫外扫描曲线

Fig.1 Scanning curves

从图 1 可看出,法夫酵母色素在可见光区的最大吸收峰为 480 nm,与罗氏公司的虾青素标样的吸收变化情况相吻合,说明虾青素是该酵母色素的主要成分,以后测定的吸光值都在 480 nm。

3.2 法夫酵母中的色素含量

以虾青素标样为基准,经 HPLC 测定后计算峰面积,见图 2。法夫酵母中总类胡萝卜素为 1 800 $\mu\text{g}/\text{g}$ 干细胞,其中虾青素含量为 78%。

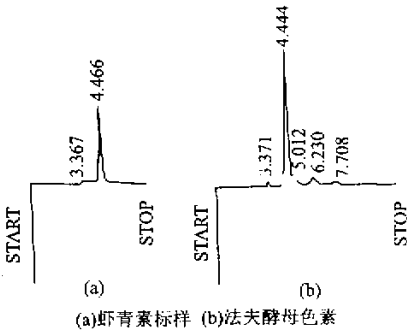


图 2 HPLC 图谱

Fig.2 HPLC chromatograms

3.3 法夫酵母色素的主要组分

类胡萝卜素的分离主要是由于它们化学结构的不同而引起的。它们在有机溶剂中溶解度的差别,可通过薄层析分离并用 R_f 值比较色素的组成成分。定性鉴定的另一种方法是在一定溶剂中测定其吸收光谱特性,由于双键的多寡、位置、取代基的种类、数量不同,其 R_f 和吸收光谱各异。TLC 分离结果见图 3,图中有 11 个明显的斑点,其对应的 R_f 值及光谱最大吸收波长见表 1。就斑点数及对应

的最大吸收波长而言,实验结果同国外报道一致^[1],但由于所用硅胶及铺板技术、层析条件等差异,所得 R_f 值有一定差异。

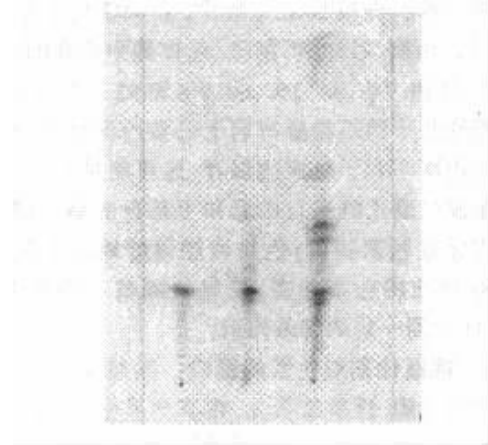


图 3 法夫酵母色素的 TLC 分离结果
Fig.3 TLC of *phaffia rhodozyma* pigment

表 1 法夫酵母色素中的类胡萝卜素组成

Tab. 1 Comparison of primary carotenoids in *Phaffia rhodozyma* pigment

类胡萝卜素	最大吸收波长(在丙酮溶液中)	R_f
1	—	0.11
2	—	0.16
3	—	0.18
4 顺式-虾青素	366 470	0.21
5 反式-虾青素	477	0.25
6	474	0.30
7	—	0.35
8	463 493 523	0.38
9	460	0.42
10 γ -胡萝卜素	438 464 496	0.58
11 β -胡萝卜素	429 452 481	0.91

3.4 色素性质的研究

3.4.1 热稳定性 取适量法夫酵母色素,溶解于石油醚(90~120℃)中并定容到 100 mL,取 10 mL,置于 10 mL 比色管中,分别放在 30、50、80、95℃的恒温水浴中保温,避光,平行测定 2 次,每隔 15 min 定时取样,流动水冷却至室温,补足溶剂后测定 480 nm 的吸光度,计算色素残存率,结果如图 4 所示。可以看出,法夫酵母色素对短时受热具有较好的稳定性,95℃水浴 90 min 后损失率仅 16%左右,可以满足一般加工如食品、化妆品加热的需要。

3.4.2 光对色素稳定性的影响 将色素溶解在丙酮中配制成一定浓度的溶液,各取 50 mL,置于 50 mL 刻度试管中,分别让不同的光照射,间隔一定时间取样测定 480 nm 的吸光度,计算色素残存率。

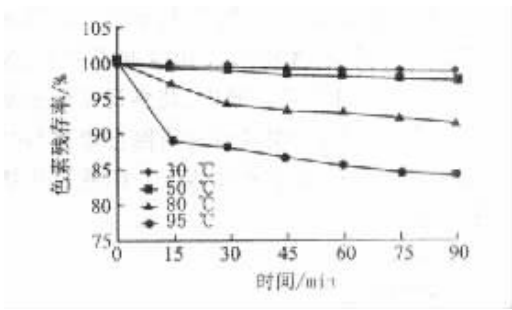


图 4 温度对色素稳定性的影响
Fig. 4 Thermal stability curve of *Phaffia rhodozyma* pigment

1) 室内自然光对色素稳定性的影响

以室温(10~15℃)避光保存为对照,测定室内自然光对色素的影响,结果见图 5。

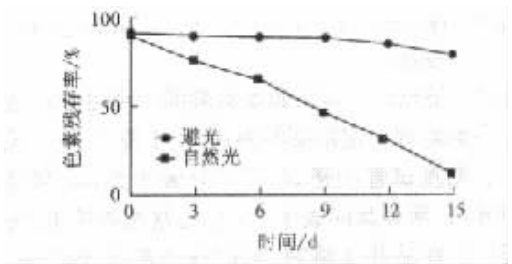


图 5 室内自然光对色素稳定性的影响
Fig. 5 The effect of light on the pigment stability

2) 阳光对色素稳定性的影响

将样品放在可以被阳光照射的室外,从早晨 8 点钟开始,每隔 20 min 测一次吸光度,结果见图 6。

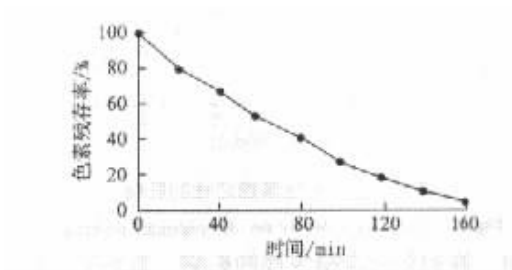


图 6 阳光对色素稳定性的影响
Fig. 6 The effect of sunshine on the pigment stability

3) 紫外光对色素稳定性的影响

采用 15 W 紫外灯在 30 cm 处照射,每隔 1 h 测定吸光度,结果见图 7。

由图 5~7 可见,光线对色素的吸光度影响很大。就光源而言,室内自然光的影响较为平缓,光照 1 d 后,色素损失 8.7%,半衰期为 9 d;其次为紫外光,光照 1 d 后,色素损失 27.7%,半衰期为 1.5 d;对色素影响最大的是阳光,只用 160 min 就几乎全部褪色,半衰期为 1 h,而避光贮存 1 d 后,色素损失为 0.7%,进一步实验表明,避光保存的半衰期为 30 d。色素对光的这种敏感性归结于类胡萝卜素分子

内部不饱和双键等特殊结构在光作用下自身氧化分解导致双键消失,使得吸收光谱发生变化,吸收波长不再出现于可见光区域内,其感观变化就是褪色.正是这种特殊结构使其具有清除自由基和抗氧化功能,可以有效阻止紫外线等不良因素对机体细胞的杀伤作用.

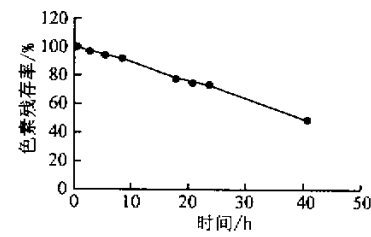


图 7 紫外线对色素稳定性的影响

Fig.7 The effect of ultraviolet radiation on the pigment stability

3.4.3 空气对色素稳定性的影响 将色素溶解在丙酮中配制成一定浓度的溶液,一个取 50 mL 置于 50 mL 刻度试管中密封,另外分装于 5 mL 刻度试管中开口.两样品同放于 25 ℃ 且避光条件下,每天将开口的样品补足溶剂,同时取样测定 480 nm 处的吸光度,计算色素残存率,结果见图 8.可见,空气中的氧也是色素褪色的一个主要因素.

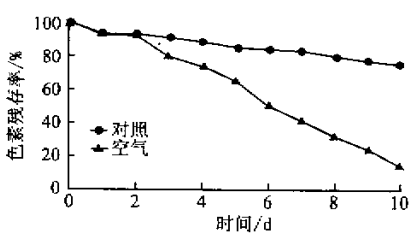


图 8 空气对色素稳定性的影响

Fig.8 The effect of air on the pigment stability

3.4.4 溶剂对色素稳定性的影响 取相同量的法夫酵母色素,分别溶解于丙酮、石油醚、氯仿、色拉油中,定容至 100 mL,避光于 4 ℃ 贮存,间隔一定时间取样测定吸光度,计算色素残存率.

1) 溶剂对色素色调的影响

相同浓度的色素在不同的溶剂中所呈现的色泽不一样,在丙酮中色调偏黄,而在氯仿中呈红色.氯仿中的最大吸收峰较丙酮中红移了 10 nm 左右,这是由于类胡萝卜素的发色基团主要是双键和羰基.溶剂的极性强弱不同,将影响发色基团中的价

电子状态,因而所需的激发能发生变化,导致吸收光谱的变化,在视觉上就是色调的变化.

2) 溶剂对色素稳定性的影响

在色素的提取加工过程中,必须使用溶剂.经 120 d 后,丙酮、石油醚、氯仿、色拉油中色素的残存率分别为 49.7%、84.2%、64.9% 和 92.3%.有机溶剂中极性最小的石油醚有利于色素的保存,而极性最大的丙酮不利于色素的保存.这可能是由于丙酮易被激发生成乙酰基自由基和甲基自由基,与虾青素反应导致色素褪色;色拉油能很好地保护色素,这可能是油将色素包裹,较好地隔离了空气中的氧,从而起到一定的屏蔽作用.

3.4.5 抗氧化剂对色素的影响 类胡萝卜由于含有不饱和双键,极易被氧化,在其产品中,常常添加抗氧化剂,因此,做了抗氧化剂对该色素的影响试验.在相同浓度的以丙酮为溶剂的色素溶液中分别添加 100 μg/g 的 BHA、BHT、TBHQ,间隔一定时间取样测定 480 nm 的吸光度,计算色素残存率,结果见图 9.可见,抗氧化剂都能延缓色素的褪色,其中 BHT 的效果最好.

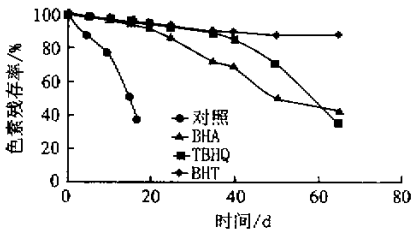


图 9 抗氧化剂对色素稳定性的影响

Fig.9 The effect of antioxidants on the pigment stability

4 结 论

法夫酵母菌株可生产天然红色色素,该色素在可见光区的最大吸收波长为 480 nm.色素对热较敏感,耐光性差,空气中的氧气对色素有破坏作用,添加抗氧化剂可提高色素的稳定性,因此,应采用避光、密闭、充 N₂ 或真空、低温贮存,抗氧化剂可延缓色素的褪色.

法夫酵母生长周期短,繁殖快,发酵工艺较为成熟,利用微生物制备功能性天然色素是极好的发展方向,符合 21 世纪的需要.

参考文献：

- [1] AN G H. Isolation of *phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content[J]. **Applied and Environmental Microbiology** ,1989 ,55(1) :16~24.
- [2] MILLER M W. The yeast a taxonomic study[M]. Amsterdam :Elsevier Science Publishers B V ,1984.
- [3] MILLER M W , YOENYAMA M , SONEDA M. *Phaffia* , a new yeast genus in the Deuteromycotina[J]. **Int J Syst Bacteriol** , 1976 ,26 :286.
- [4] NELIS N J , DE LEENHEER A P. Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds[J]. **J Appl Bacteriology** , 1991 ,4(2) :107~112.
- [5] WATARU MIKI. Biological functions and activities of animal carotenoids[J]. **Pure Appl Chem** ,1991 ,63(1) :141~146.
- [6] LEE S H , MIN D B. Effects of quenching mechanisms and kinetics of carotenoids in chlorophyll - sensitised photo - oxidation of soybean oil[J]. **J Agric Food Chem** ,1990 ,38(8) :1630.
- [7] TANAKA T , MORISHITA Y , SUZUI M , *et al.* . Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by naturally occurring carotenoid astaxanthin[J]. **Carcinogenesis** ,1994 ,15(1) :15~19.
- [8] TANAKA T , MAKITA H , OHNISHI H , *et al.* . Chemoprevention of rat oral carcinogenesis by naturally occurring xanthophylls astaxanthin and canthaxanthin[J]. **Cancer Res** ,1995 ,55(18) :4059~4063.
- [9] JOHNSON E A , VILLA T G , LEWIS M J. *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets[J]. **Aquaculture** , 1980 ,20 :123~127.
- [10] JOHNSON E A , LEWIS M J , GRAU C R. Pigmentation of egg yolks with astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma* [J]. **Poultry Sci** , 1980 ,59 :1777~1782.
- [11] 徐学明 , 金征宇 , 刘当慧. 虾青素的制备与应用[J]. 无锡轻工大学学报 , 1999 ,18(增刊) :184~187.
- [12] 徐学明 , 金征宇 , 刘当慧等. 法夫酵母产虾青素摇瓶工艺的研究[J]. 无锡轻工大学学报 , 2000 ,19(3) :230~234.
- [13] JAMES SEDMAK J , DEEPTHI K. Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*[J]. **Biotechnology Technique** ,1990 ,4(2) :107~112.