

文章编号:1673-1689(2009)04-0532-03

芦丁水解液发酵法制备 L-鼠李糖的工艺

李玉山

(西安惠丰生化集团股份有限公司, 陕西 西安 710075)

摘要: 利用发酵法从芦丁水解液中制备 L-鼠李糖, 选取酵母用量、发酵时间和发酵温度 3 个影响因素, 采用均匀设计和 T 型关联度分析法进行了优化。得到最佳发酵工艺为: 酵母用量为母液的 3%, 发酵时间为 5 h, 发酵温度为 35 ℃, 产品质量浓度为 9.52 g/L。

关键词: L-鼠李糖; 发酵; 均匀设计; T 型关联度分析

中图分类号: TQ 920.6

文献标识码: A

Study on the Extracting of L-Rhamnose from the Hydrolyzation Liquid of Rutinum by Ferment

LI Yu-shan

(Xi'An Hui Feng Biochemistry Group Share Co., LTD, Xi'An 710075, China)

Abstract: In this manuscript, the extraction and purification process of L-Rhamnose from the hydrolyzation liquid of rutinum were investigated by uniform design and T's correiation coefficient. the fermentation conditions such as the amount of yeast, fermentation time and temperature, were optimized as follows: yeast amount 3%, ferment time 5 h and ferment temperature 35 ℃. By this optimum conditions, the highest concentration of L-rhamnose achieved at 9.52 g/L.

Key words: L-rhamnose, ferment, uniform design, T's correiation coefficient

L-鼠李糖(L-Rhamnose, CAS 3615-14-16)是一种甲基戊糖,属单糖类,能溶于水和甲醇,结晶形式有两种—— α 型和 β 型。 α 型含一分子结晶水,加热后失水转化为 β 型; β 型极易吸潮,空气中又转化为 α 型。常见的为 α -L-鼠李糖^[1-2]。L-鼠李糖主要用于生化研究和医药食品等领域,可合成强心药物,合成香料 Furaneol,与其他物质反应形成风味物。在科学研究中也有广泛的应用,可作为食品添加剂添加于高档咖啡、饮料、肉类中^[3]。生产 L-鼠李糖可直接采用发酵法,但目前还未工业化生产,主要通过从天然植物中提取的一些含有 L-鼠李糖基的化合物,通过水解而获得 L-鼠李糖。作者正是

基于此思路从芦丁水解液中通过发酵制得 L-鼠李糖,理论上 1 mol 芦丁水解可得 1 mol 槲皮素,1 mol/L-鼠李糖和 1 mol 葡萄糖,槲皮素通过过滤可除去,因此芦丁水解液中主要含有 L-鼠李糖和葡萄糖,二者共存很难结晶,而葡萄糖可被酵母发酵生成乙醇^[4],由此可除去葡萄糖。作者主要对发酵的工艺条件进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

NF11 版芦丁由西安天诚医药生物公司提供,

收稿日期:2008-08-06

作者简介:李玉山(1974-),男,陕西西乡人,工学硕士,工程师,主要从事天然产物化学合成方面的研究。

Email:liyushan0508@sina.com

对照品购自 Sigma 公司; 酵母粉(安琪酵母), 乙醇, 浓硫酸, 氢氧化钡, 正丁醇, 乙醇, 水, 硝酸银均为分析纯; GF₂₅₄ 藻层析硅胶板; 青岛海洋化工厂生产。R-201 旋转蒸发器: 上海申科机械研究所制造; BS1101 型电子天平: 北京赛多利斯制造; 101-2-BS 电热鼓风干燥箱: 上海跃进医疗仪器厂制造; 美国 waters 高效液相色谱仪; PHS-3C 数字精密酸度计: 上海思龙科学仪器有限公司产品。

1.2 TLC 条件的建立

因发酵过程中要不断用到 TLC 定性检查, 展开剂为正丁醇: 乙酸: 水 = 4: 1: 5, 显色剂为硝酸银。

1.3 芦丁水解液发酵前的处理

因芦丁水解液呈强酸性, 如何脱酸, 有两种方案。方案一是以石灰乳调水解液 pH 7 左右, 过滤, 但石灰乳中和后生成硫酸钙。硫酸钙在水中仍有一定溶解性, 会在后处理中带来杂质, 而且过滤非常困难; 方案二是以固体氢氧化钡调水解液 pH 7 左右, 过滤。

1.4 发酵的单因素影响

1.4.1 酵母用量的影响 取 100 mL 水解中和液 5 份, 加入 1, 2, 3, 4, 5 g/dL 的酵母, 其他条件相同, 测定发酵液中 L-鼠李糖质量浓度。

1.4.2 发酵时间的影响 取 100 mL 水解中和液 5 份, 加入 3 g/dL 酵母, 发酵时间分别为 1、2、3、4、5 h。其他条件相同, 测定发酵液中 L-鼠李糖质量浓度。

1.4.3 发酵液 pH 值的影响 取 100 mL 水解中和液各 5 份, 加入 3 g/dL 酵母, 调 pH 值为 3、4、5、6、7, 发酵 2 h, 其他条件相同, 测定发酵液中 L-鼠李糖质量浓度。

1.4.4 发酵液温度的影响 取 100 mL 水解中和液各 5 份, 加入 3 g/dL 酵母, 在 pH 5 的条件下, 发酵 5 h, 发酵温度分别为 20、25、30、35、40 °C, 其他条件相同, 测定发酵液中 L-鼠李糖质量浓度。

1.5 均匀设计

选取酵母用量(X_1), 发酵时间(X_2), 发酵温度(X_3)为影响因素^[5]。

1.6 T 型关联度分析优化

选取酵母用量(X_1), 发酵时间(X_2), 发酵温度(X_3)为 3 个影响因素^[6]。

2 结果与讨论

2.1 水解液的前处理

经过实验, 发现以氢氧化钡为脱酸剂较好, 生

成的硫酸钡在水中溶解度极低, 过滤时可充分除去, 为后序工艺处理带来极大便利, 而硫酸钙在水中有一定溶解度, 后处理中会带来大量杂质。因此选择氢氧化钡为脱酸剂。

2.2 酵母用量对发酵的影响

由图 1 可知, 在酵母用量从 1 g/dL 到 2 g/dL 时, 发酵液中 L-鼠李糖质量浓度几乎不变; 当酵母用量上升至 3 g/dL 时, L-鼠李糖质量浓度达最大; 由 3 g/dL 上升至 5 g/dL, L-鼠李糖质量浓度几乎不变。由此可知, 3 g/dL 的酵母量即可将葡萄糖完全分解。由 TLC 也可看出, 1, 2 g/dL 的酵母用量时可明显看出葡萄糖的斑点, 而 3, 4, 5 g/dL 的酵母用量时无葡萄糖斑点, 由此可知葡萄糖已全部分解, 从经济角度考虑, 选择 3 g/dL 的酵母用量。

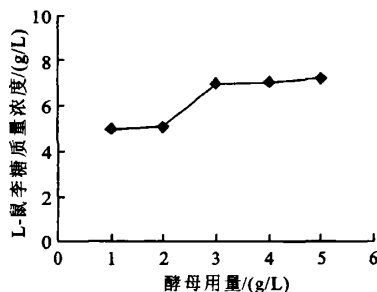


图 1 酵母用量对发酵的影响

Fig. 1 Effect of yeast amount

2.3 时间对发酵的影响

由图 2 可以看出, 从 1 h 到 4 h, L-鼠李糖的质量浓度不断上升, 4 h 时达最大。从 4 h 到 5 h, L-鼠李糖质量浓度基本不变, 由此确定发酵时间 4 h 较为合适。4 h 时 TLC 图中已无葡萄糖斑点, 这说明 4 h 内反应较充分。

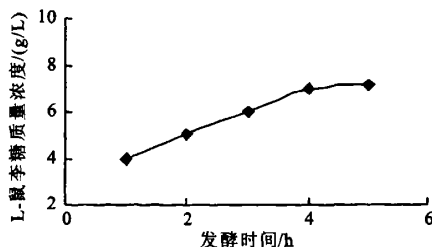


图 2 发酵时间对发酵的影响

Fig. 2 Influence of fermentation time

2.4 pH 值对发酵的影响

由图 3 可知, pH 6 时提取效果强, 偏离此, 酵母的空间构象发生改变, 活力降低, 甚至导致失活。pH 过大会导致后处理中发生美拉德反应等非酶褐变, 导致 L-鼠李糖质量浓度降低, 可见 pH 值对 L-

鼠李糖的提取有显著影响,故选择 pH 6 为宜。

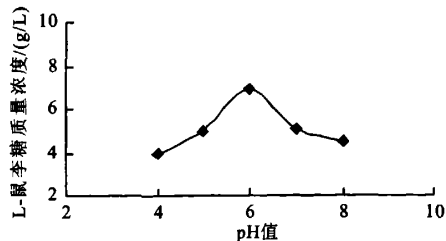


图3 pH值对发酵的影响

Fig. 3 Influence of pH value

2.5 温度对发酵的影响

由图4可知,温度也是一个关键因素。温度为35℃时,提取量最高,发酵效果好;当温度高于35℃时,L-鼠李糖质量浓度下降。一方面,温度升高使酵母失活;另一方面,L-鼠李糖在高温下也会发生一系列降解反应,如热分解,美拉德反应等非酶褐变,可见温度的影响非常重要。

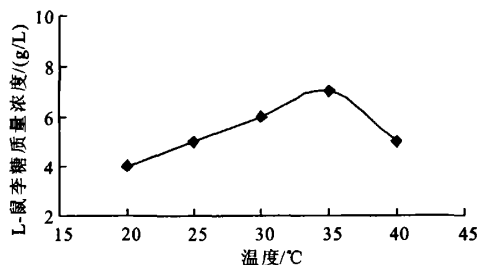


图4 温度对发酵的影响

Fig. 4 Influence of fermentation temperature

2.6 均匀设计结果

均匀设计结果见表1。

2.7 T型关联度分析法优化

T型关联度分析法优化结果见表2。

计算 x_1, x_2, x_3 的关联度分别为-0.005, 0.213, 0.227, 由此得各因素影响大小顺序为 $x_3 > x_2 > x_1$, 即发酵温度>发酵时间>酵母用量。

由均匀设计及T型关联度分析法综合分析知最佳工艺为:酵母质量浓度为3 g/dL,发酵时间为5 h,

发酵温度为35℃,发酵液pH值为6,在此条件下L-鼠李糖的质量浓度达9.52 g/L。

表1 均匀设计结果

Tab. 1 Results of uniform design

试验号	酵母质量浓度/(g/dL)	发酵时间/h	发酵温度/℃	L-鼠李糖质量浓度/(g/L)
1	1	2	30	6.35
2	2	4	45	8.24
3	3	6	25	8.12
4	4	1	40	5.26
5	5	3	20	5.47
6	6	5	35	9.48
7	7	7	50	7.38

表2 T型关联率系数计算结果

Tab. 2 Results of T's correlation coefficient

No	1	2	3	4	5	6	Di
$ V_{c_1} $	1	1	1	1	1	1	1.00
$ V_{c_2} $	2	2	5	2	2	2	2.50
$ V_{c_3} $	15	20	25	20	15	15	17.5
$ V_{c_0} $	1.89	0.12	2.86	0.21	4.01	2.10	1.87
V_{y_1}	1	1	1	1	1	1	
V_{y_2}	0.8	0.8	-2	0.8	0.8	0.8	
V_{y_3}	0.86	-1.14	1.43	-1.14	0.86	0.86	
V_{y_0}	1.01	-0.06	-1.53	0.11	2.14	-1.12	
$x_{0,1}(k)$	0.99	-0.06	-0.65	0.11	0.47	-0.89	
$x_{0,2}(k)$	0.79	-0.08	0.77	0.14	0.37	-0.71	
$x_{0,3}(k)$	0.85	0.05	0.93	-0.10	0.40	-0.77	

3 结语

L-鼠李糖具有多种活性功能及广泛的用途,从芦丁水解液中利用发酵法制备L-鼠李糖,通过均匀设计和T型关联度分析得到最佳工艺为:酵母质量浓度为3 g/dL,发酵时间5 h,发酵温度35℃,发酵液pH值为6,结果得到发酵液中L-鼠李糖质量浓度高达9.52 g/L。

参考文献(References):

- [1]《化学化工大辞典》编委会. 化学化工大辞典[M]. 北京:化学工业出版社,2003.
- [2]中国医药公司上海化学试剂采购供应站. 试剂手册[M]. 上海:上海化学技术出版社,1985.
- [3]浦跃武,刘卫斌,陈志明. 鼠李糖的研究现状及其应用[J]. 食品工业科技,2002,2:84-85.
PU Yao-wu, LIU Wei-bin, CHEN Zhi-ming. Research and application of Rhamnose[J]. Science and Technology of Food Industry, 2002, 2: 84-85. (in Chinese)
- [4]谢笔钧. 食品化学[M]. 北京:科学出版社,2007:57-62.
- [5]洪伟,吴承楨. 实验设计与分析原理[M]. 北京:中国林业出版社,2004:148-150.
- [6]邓聚龙. 灰色预测与决策[M]. 武汉:华中理工大学出版社,1986.

(责任编辑:李春丽)