

栀子蓝色素制备及纯化工艺的研究

杨志¹, 张芳¹, 李梅², 甘纯玟²

(1. 福建农林大学食品科学学院, 福建 福州 350002) (2. 福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350002)

摘要: 本文采用纤维素酶水解京尼平甙生成京尼平, 京尼平再与氨基酸合成栀子蓝色素, 利用超滤技术对其进行分离、纯化。通过一系列的单因素实验和正交实验, 探讨了制备及纯化栀子蓝色素的工艺条件。结果表明, 最佳工艺条件为以谷氨酸钠作为氨基酸来源, 液固比 (V/m) = 8:1, 酶解时间 6 h, 纤维素酶与京尼平甙的质量比 1:8, 氨基酸与京尼平甙的质量比 1:2, 反应时间 96 h。最佳超滤纯化工艺为超滤膜截至分子量为 5000 Da, 超滤压力 0.5~0.8 MPa, pH 7, 超滤温度为室温。经 HPLC 测定, 经本工艺制备的栀子蓝色素色价 $E_{590\text{nm}}^{1\text{cm}}$ (1%) ≥ 192 , 纯度 $\geq 95\%$ 。

关键词: 栀子蓝色素; 超滤; 纤维素酶; HPLC

中图分类号: TS202.3; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)04-0352-05

Isolation and Purification of Gardenia Blue Pigment with Ultra Filtration

YANG Zhi¹, ZHANG Fang¹, LI Mei², GAN Chun-ji²

(1. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

(2. College of life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: In this study, gardenia blue pigment was synthesized using amino acids and genipin which was produced via cellulose-catalyzed hydrolysis of geniposide. And the isolation and purification of the achieved pigment by ultra filtration were optimized by single factor test and orthogonal test. The results indicated that the most suitable amino acid, ratio of liquid to solid, the enzymatic hydrolysis time, molar ratio of cellulase to geniposide, molar ratio of amino acids to geniposide and reaction time were Glu, 8:1(v/w), 6 h, 1:8(g:g), 1:2(g:g), and 96 h, respectively. The best purification conditions were as follows: the retention molecular weight of 5000 Da, operating pressure of 0.5~0.8 MPa, room temperature and pH value of 7. Under those conditions, the gardenia blue pigment was achieved with high $E_{590\text{nm}}^{1\text{cm}}$ (1%) value (≥ 192) and purity ($\geq 95\%$).

Key words: gardenia blue pigment; ultrafiltration; cellulose; HPLC

栀子蓝色素是近年广受关注的一种天然水溶性蓝色素^[1,2]。它是以茜草科植物—栀子中所含的化学成分京尼平甙 (*geniposid*) 为原料, 利用 β -1,4-葡糖甙酶 (EC3.2.1.21, β -glucosidase) 酶解京尼平甙 (*geniposide*), 脱去其分子末端的葡萄糖基 (*glu*), 得到京尼平 (*genipin*), 京尼平 (*genipin*) 再与氨基酸发生一系列的聚合、重排反应, 反应完成后, 经干燥即可制得栀子蓝色素^[3]。

当前栀子蓝色素的制备主要采用高产 β -1,4-葡糖甙酶的微生物进行发酵^[4,5], 而后一般采用大孔树脂对发酵液进行脱盐、精制和纯化^[6]。这种工艺存在着培养基与色素分离困难, 树脂不易再生, 纯化效率低, 产品色价较低等诸多问题, 影响色素制品的应用。因此有必要改进其生产工艺对其进行进一步的分离纯化

研究。

超滤是一种新兴的生化分离技术, 广泛应用于化工、食品、医药及废水处理等领域^[7]。超滤不但具有耗能低、单级分离效率高, 工艺简单等优点, 而且分离纯化所得制品的收率高。

本文采用纤维素酶酶解京尼平甙, 利用超滤技术对栀子蓝色素进行分离纯化, 以 HPLC 为检测手段, 通过设置单因素实验和正交实验确定制备及纯化栀子蓝色素的最佳工艺条件。旨在提供一种经济、简单和高效的栀子蓝色素生产工艺。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

京尼平甙 (福州海东生物科技公司提供); 纤维素酶 (无锡酶制剂厂); 谷氨酸钠 (福州味精厂); 醋酸

收稿日期: 2007-12-01

和醋酸钠 (AR)。

1.2 仪器及设备

LGJ1.5 真空冷冻干燥机 (军事医学科学院北京四环仪器厂); UV-1600 分光光度计 (北京瑞利分析仪器公司); 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); 二极管阵列检测器 (美国 Waters 公司) 键合相凝胶柱 (Biosep-SEC-S2000 键合相凝胶柱, 300×7.8mm); 螺旋板式超滤机 (厦门福美生物科技有限公司); 超滤膜 (聚砜材料膜)。

1.3 实验方法

1.3.1 栀子蓝色素制备工艺流程

纤维素酶→酶液→京尼平甙酶解→京尼平→氨基酸聚合→栀子蓝色素溶液→超滤 (UF)→冷冻干燥→栀子蓝色素粉末

1.3.2 纤维素酶液制备方法

取纤维素酶粉末, 溶于 pH 4.5 的 HAc-NaAc 缓冲液中。50 °C 下振荡提取 30 min 后, 经抽滤, 收集滤出液即得所需的纤维素酶液。

1.3.3 色素色价的测定及计算方法

栀子蓝色素 (粉末) 的色价可按式计算:

$$E_{590\text{nm}}^{1\text{cm}} (1\%) = A \times f / (m \times 100) \quad (\text{a})$$

式中: A 以 1 cm 玻璃比色皿在蒸馏水做参照下, 在 590 nm 的波长下测得的吸光度值; f 稀释倍率; m 栀子蓝色素的粉末质量。

测定方法:

准确称取一定质量的栀子蓝色素粉末, 溶解于蒸馏水中, 稀释到适当倍数后, 用容量瓶定容, 以 1 cm 玻璃比色皿在蒸馏水做参照下, 在 590 nm 的波长下测定其吸光度值, 代入 (a) 式计算。

1.3.4 吸光度增长率的测定及计算

每 12 h 取反应液 1 mL, 稀释至其吸光度 A 在 0.3~0.8 之间, 计算反应体系总的吸光度, 并分别与初始溶液的吸光度值进行比较, 按以下公式计算反应的吸光度增长率:

$$\text{吸光度增长率} (\%) = (J - J_0) / J_0$$

$$J = A \times f \times V$$

式中, J 为设定时间后所测得的体系总的吸光度; J₀ 为初始体系溶液总的吸光度; A 为由 1 mL 反应液稀释所得样品在 595 nm 以蒸馏水作参比测定吸光度; f 为其稀释倍数; V 为反应体系总体积。

1.3.5 HPLC 分析方法

固定相: 键合相凝胶柱 (300×7.8 mm), 流动相: 水 (色谱纯), 进样体积: 50.00 μL, 运行时间: 30 min。

1.3.6 正交实验因素和水平的确定

表 1 L9 (3⁴) 正交实验因素与水平表

Table 1 Factors and levels design of L9(3⁴) orthogonal test

| 水平 | A(料液比/(g/mL)) | B(酶解时间/h) | C(酶甙比) | D(氨基酸与甙比) |
|----|---------------|-----------|--------|-----------|
| 1 | 1:10 | 6 | 1:12 | 5:10 |
| 2 | 1:8 | 12 | 1:10 | 7:10 |
| 3 | 1:6 | 20 | 1:8 | 9:10 |

其中, 料液比=京尼平甙的质量/反应体系总体积; 酶甙比=酶的质量/京尼平甙的质量; 氨基酸与甙比=氨基酸质量/京尼平甙的质量。

1.3.7 膜通量的计算

膜通量按下式计算:

$$J = V / (A \times t)$$

式中 J 为膜通量 (L·m⁻²·h⁻¹), V 为透析液体积 (L), A 为膜的有效面积 (m²)

1.3.8 在线监测透析液的灰分

采用电导率法监控透析液中的灰分, 电导率的变化可以反映灰分含量的变化情况。

2 结果与分析

2.1 纤维素酶解法制备栀子蓝色素工艺的优化

2.1.1 氨基酸反应时间对栀子蓝产率的影响

取谷氨酸钠作为氨基酸的来源, 控制实验条件为: 料液比 1:8, 酶甙比 1:8, 氨基酸与甙比 5:10。50 °C 恒温条件下, 京尼平甙酶解 12 h 后加入谷氨酸钠继续反应并每隔 12 h 取样测定样品在 595 nm 下的吸光度。按 1.3.4 所述方法计算色素吸光度增量率, 结果如图 1 所示。

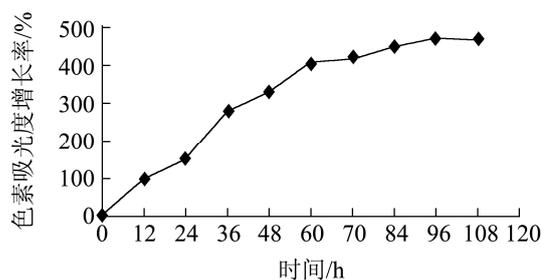


图 1 氨基酸反应时间对栀子蓝产率的影响

Fig.1 Effect of amino acids reaction time on the pigment yield

如图 1 所示, 0~96 h 内色素吸光度增长率逐渐增加且增长速度逐渐变缓, 反应 96 h 后, 色素吸光度增长率基本保持不变。故可确定京尼平与氨基酸的反应时间为 96 h。

2.1.2 氨基酸种类对栀子蓝色素产率的影响

控制试验条件为: 料液比 1:8, 酶甙比 1:8, 纤维

素酶酶解京尼平甙 12 h, 氨基酸与甙比 1:2, 分别用谷氨酸、谷氨酸钠、亮氨酸、甘氨酸和组氨酸作为氨基酸来源做平行实验, 试验经 HPLC 测定, 结果如表 2。

表 2 氨基酸种类对栀子蓝色素产率的影响

| Table 2 Effects of amino acids kinds on the pigment yield | | | | | |
|-----------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 氨基酸种类 | 谷氨酸钠 | 亮氨酸 | 组氨酸 | 谷氨酸 | 甘氨酸 |
| 最大吸收峰/nm | 594.5 | 595.7 | 594.5 | 590.8 | 587.1 |
| 栀子蓝峰高的校正系数 α | 1 | 1.663 | 0.73 | 1.43 | 2.17 |

从表 2 可看出, (1) 谷氨酸钠和亮氨酸体系的最大吸收波长为 595 nm, 可以产生色调纯正的蓝色, 经比较可以发现, 亮氨酸色谱峰面积校正系数为 1.66, 但谷氨酸钠体系却有着成本低廉、来源广泛等优势^[6], 故对于工业生产, 选择谷氨酸钠作为原料具有现实意义。(2) 谷氨酸和甘氨酸体系反应色素最大吸收峰紫移, 该色素如果能够与红色素调和成为葡萄紫将会有新的应用前景。

2.1.3 纤维素酶量对栀子蓝产率的影响

取谷氨酸钠作为氨基酸来源, 控制实验条件为: 酶解时间 12 h, 料液比 1:8, 氨基酸与甙比 5:10, 设定酶甙比分别为 1:4、1:6、1:8、1:10、1:12, 与氨基酸反应 96 h 后测定吸光度增长率如图 2 所示。

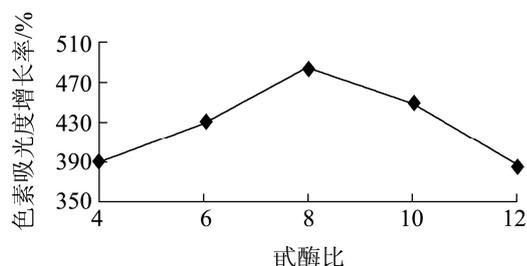


图 2 酶量对栀子蓝色素产率的影响

Fig.2 The effect of cellulase enzyme used in reaction on the pigment yield

从图 2 可知, 酶甙比为 1:8 时色素吸光度增长率最高, 可能是当纤维素酶用量过少时, 不能使底物京尼平甙充分酶解为京尼平从而影响了后期与氨基酸的显色反应, 而纤维素酶用量过多后, 可能由于引入过多杂质影响了色素的品质。

2.1.4 料液比对栀子蓝产率的影响

进行料液比的单因素试验, 控制条件如下: 酶甙比 1:8, 氨基酸与甙比 5:10, 取谷氨酸钠作为氨基酸的来源, 做 3 组平行实验使反应体系料液比分别为 1:10、1:8、1:6、每隔 12 h 取样测量体系反应液的总的吸光度并计算其色素吸光度增长率, 测量计算所得

结果如图 3 所示。

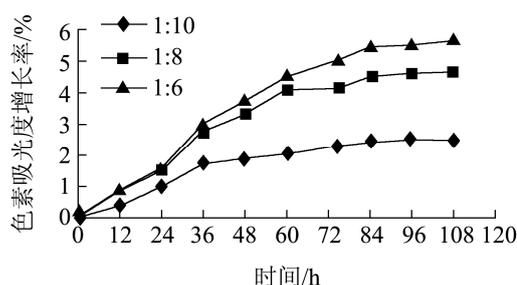


图 3 料液比对栀子蓝产率的影响

Fig.3 The effect of solid to liquid ratio on the pigment yield

图 3 结果表明, 随着料液比的增大, 色素吸光度增长率也增大, 色素的产量也将增大, 该实验料液比为 1:6 的反应体系效果最好。

2.1.5 正交实验

表 3 L₉(3⁴) 正交试验结果表

| Tab.3 Results of L ₉ (3 ⁴) orthogonal test | | | | | |
|-------------------------------------------------------------------|--------|--------|--------|-------|-----------------------------------|
| 实验号 | A | B | C | D | 色价 E _{1%} ^{1cm} |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 77.64 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 67.95 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 69.17 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 80.59 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 85.70 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 49.50 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 83.77 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 57.60 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 69.44 |
| T ₁ | 214.76 | 242.0 | 184.74 | 232.7 | 8 |
| T ₂ | 215.79 | 211.25 | 217.98 | 201.2 | 2 |
| T ₃ | 210.81 | 188.11 | 238.64 | 207.3 | 6 |
| T ₁ | 71.59 | 80.67 | 61.58 | 77.59 | |
| T ₂ | 71.93 | 70.42 | 72.66 | 67.07 | |
| T ₃ | 70.27 | 62.70 | 79.55 | 69.12 | |
| R | 1.66 | 17.96 | 17.97 | 10.52 | |

L₉(3⁴)正交试验结果如表 3 所示, 观察 R 值结果表明, 酶解时间和酶甙比对色素色价的影响显著, 其次是氨基酸与甙比的影响, 反应体系的料液比影响最小; 经计算分析栀子蓝色素产量最高的因素水平是: 料液比 1:8, 酶解时间 6 h, 酶甙比 1:8, 氨基酸与甙比 5:10; 而直接从正交表观察得到的最佳因素水平是料液比 1:8, 酶解时间 12 h, 酶甙比 1:8, 氨基酸与甙比 5:10。为确定最佳因素水平, 进行验证实验。控制

反应条件为料液比 1:8, 酶解时间 6 h, 酶甙比 1:8, 氨基酸与甙比 5:10。产品经干燥后测得色价 $E_{590\text{nm}}^{1\text{cm}}$

(1%) 为 79.3, 故确定制备栀子蓝色素的最佳工艺条件为最高的因素水平是: 料液比 1:8, 酶解时间 6 h, 酶甙比 1:8, 氨基酸与甙比 5:10。

2.2 超滤 (UF) 纯化栀子蓝色素工艺的优化

2.2.1 压力对膜通量的影响

图 4 表明压力对膜通量的影响。以温度为 25 °C 和 pH 7 为约束条件, 使操作压力从 0.33 MPa 逐渐上升到 0.77 MPa, 发现膜通量随着压力的增大而增大, 而且在压力较少时膜通量变化幅度较大, 当压力超过 0.77 MPa 后, 其增大变化率趋于平缓。

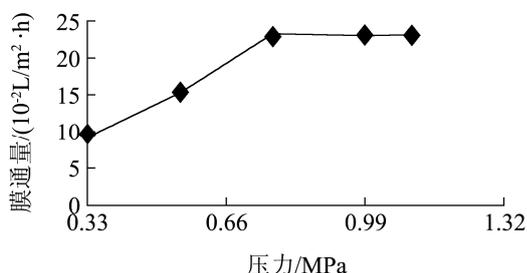


图 4 压力对膜通量的影响

Fig.4 The effect of pressure on membrane flux

这是因为超滤 (UF) 过程是以压力为驱动力, 其大小会直接影响膜通量。实验结果表明, 在运行中随着浓度极化加剧, 逐步形成凝胶层, 膜通量趋于极限值, 所以不再随压力的增大而增大。考虑到实际情况, 故选择 0.5~0.8 MPa 为超滤最适压力。

2.2.2 pH 对膜通量的影响

以 25 °C、压力为 0.6 MPa 为约束条件, 调节料液 pH, 超滤 (UF), 其结果用图 5 表示。

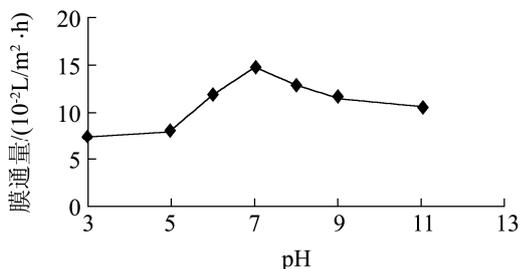


图 5 pH 对膜通量的影响

Fig.5 The effect of pH on the membrane flux

从图 5 中可以看出, 栀子蓝色素溶液在 pH 7 时, 膜通量最大, 在酸性和碱性环境下膜通量都有所降低, 究其原因, 主要是酸性和碱性条件下都不同程度地影响了色素的稳定性。

2.2.3 温度对膜通量的影响

以压力 0.6 MPa、pH 7 为约束条件, 改变超滤 (UF)

温度, 不同温度对膜通量的影响如图 6 所示。

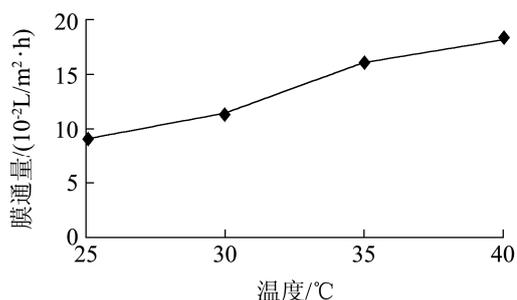


图 6 温度对膜通量的影响

Fig.6 The effect of temperature on membrane flux

图 6 结果表明, 随着温度的升高, 膜通量逐渐增加。这是因为温度升高时, 扩散系数和传质系数增大, 相应会减弱膜表面的浓差极化, 故膜通量增加; 但是, 温度升高时, 加速了膜材料的微观布朗运动, 使瞬间单位体积的小孔几率增加, 从而影响膜的截留性能, 造成截留率有所下降。综合考虑膜的性能, 料液稳定性以及操作方便, 采用室温操作。

综上所述, 栀子蓝色素在 0.5~0.8 MPa、pH 7、室温下进行超滤 (UF) 纯化所得的效果最佳。在操作上将栀子蓝色素粗制品经过 5000 Da 膜超滤 (UF) 后收集其浓缩液, 经过真空冷冻干燥即可得到栀子蓝色素的精制品。

2.2.4 超滤 (UF) 过程对栀子蓝色素脱盐效果的影响

以温度 25 °C、pH 7 为约束条件, 料液电导率随超滤 (UF) 时间的变化如图 7 所示。

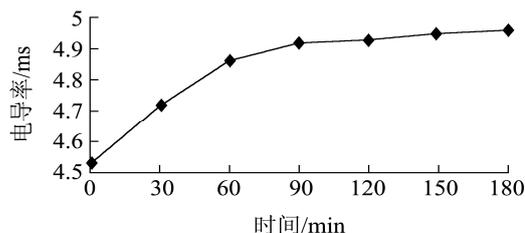


图 7 透析液电导率随超滤 (UF) 时间的变化趋势

Fig.7 Effects of dialysis conductance with different UF time

图 7 结果表明, 在 0~60 min 中, 透析液的电导率随着超滤 (UF) 时间增长的较快, 在 60~120 min 中, 随着超滤 (UF) 膜上凝胶极化的作用导致脱盐效果减弱, 最终在超滤 (UF) 时间达到 120 min 后, 电导率基本上达到稳定不再发生变化。

2.2.5 HPLC 法表征超滤法纯化栀子蓝色素的效果

由于栀子蓝色素是在一个复杂的反应体系中生成的, 经过酶促反应和氨基酸发酵两步反应, 色素中混有大量的杂质, 而且色素有很多被蛋白质等大分子物质所吸附, 通过对栀子蓝色素的超滤 (UF) 实验可以

发现, 栀子蓝色素的分子量要大于 5000 Da, 且栀子蓝色素是一种水溶性色素, 故适合用高效凝胶过滤色谱 (SEC) 对其进行进一步的分离纯化^[8]。在使用色谱的同时, 通过使用二极管阵列检测器, 达到色谱与光谱联用, 以得到各物质的光谱定性信息。超滤前和超滤后的栀子蓝色素的 HPLC 图谱如图 8、图 9 所示。

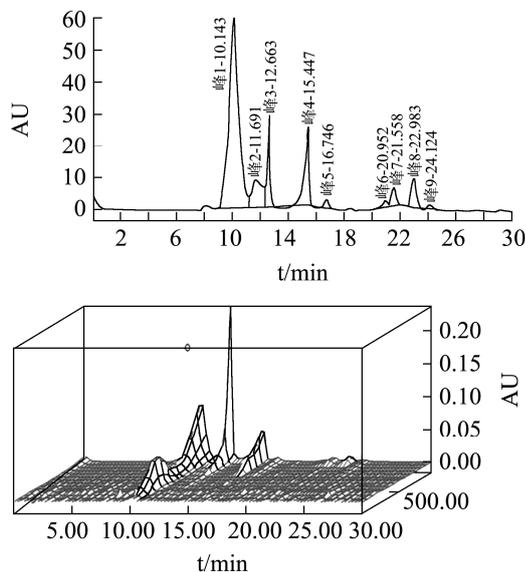


图 8 超滤 (UF) 纯化前的栀子蓝色素 ($E_{590nm}^{1cm}(1\%)=90$) 的 HPLC 图

Fig.8 The HPLC spectrogram of the pigment before UF purify

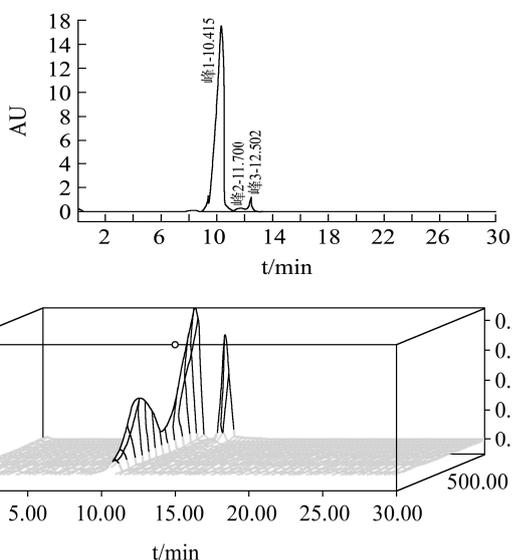


图 9 超滤 (UF) 纯化后的栀子蓝色素 ($E_{590nm}^{1cm}(1\%)=190$) 的 HPLC 3D 图

Fig.9 The HPLC spectrogram of the pigment after UF purify

从色谱图中可以清晰得到栀子蓝色素中各物质按分子量大小的分布。根据色谱—光谱联用给出的 3D 图可知, 图 8、图 9 中的峰 1 在 590 nm 附近有最大吸收峰, 在图 8 中其余的色谱峰可能是反应物 (原料) 带进的杂质或反应没有进行完全的中间产物。这些物质残留在栀子蓝色素中影响了色素的色价、品质和应用。此外从图 9 可知, 经过超滤纯化后小分子物质完全除去了, 栀子蓝色素的纯度得到了明显的提高, 色谱峰高从 0.06 AU 上升到 0.16 AU, 色谱峰纯度从 61% 上升到 95% 提高了 55.7%, 色价从 85.7 上升到 192 提高了 124%, 可见超滤技术可对栀子蓝色素进行较好的分离、纯化, 提高色素的品质和色价。

3 讨论

3.1 由于在栀子蓝色素的超滤纯化过程中随着超滤时间的延长发生了浓差极化现象, 在超滤膜表面上形成了凝胶层, 这些都影响了膜通量和超滤效率最终导致色素纯化效果的降低。故可以采用多次循环超滤的方法对栀子蓝色素进行超滤纯化。

3.2 通过超滤实验发现, 栀子蓝色素是一种较大分子的水溶性色素, 给色能力较强, 其分子结构、聚合方式和显色机理还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 阎少辉,张德权.栀子色素研究进展与开发[J].食品研究与开发,2000(12):28-30
- [2] 张春江.食品着色剂手册[M].北京:中国计量出版社, 2006
- [3] 吴拾荆,张继川,张平安.栀子蓝发酵过程中的呈色机理及提高产品质量的途径[J].全国食品添加剂通讯,1992 (3): 90-93
- [4] 傅向阳,李世杰,方尚玲.杆菌发酵栀子黄废液产栀子蓝色素的摇瓶发酵优化[J].中国食品添加剂.2002(2):33-36
- [5] 李世杰,方尚玲.液态发酵栀子蓝产栀子蓝色素工艺条件研究[J].食品科学.2001,22(8):46-49
- [6] 李佳春,梁华正,吴志梅,李媛.大孔树脂分离纯化栀子蓝色素的研究[J].食品科技,2005(7):50-53
- [7] 陈少洲,陈芳.膜分离技术与食品加工[M].北京:化学工业出版社,2005.2
- [8] 于世林.高效液相色谱方法及应用[M].北京:化学工业出版社,2002