

生物合成法生产 β -胡萝卜素发酵条件研究

戴德慧^{1,2}, 胡伟莲^{2,*}, 吕圭源¹, 李 巍¹

(1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州

310053 2. 浙江科技学院生物与化学工程学院, 浙江 杭州

310012)

摘 要: 对三孢布拉氏霉菌生物合成 β -胡萝卜素的发酵条件进行了研究。在一系列单因素试验的基础上, 初步得到 β -胡萝卜素合成的发酵条件, 分析了各因素对 β -胡萝卜素产量及发酵生物量进行了分析。经正交设计优化后, 得到三孢布拉氏霉菌的最佳发酵条件为: 发酵温度为 28℃, 初始 pH 为 7.0, 正负菌种接种比例 1:1, 接种量为 6%, 发酵时间为 156~162h, 种龄 42h, 在此优化的发酵条件下, 三孢布拉氏霉菌的 β -胡萝卜素产量为 772.47mg/L, 比优化前提高了 117.3%。

关键词: 三孢布拉氏霉菌; β -胡萝卜素; 生物合成; 正交设计

Study on Fermentation Conditions of β -carotene by Biosynthesis

DAI De-hui^{1,2}, HU Wei-lian^{2,*}, LÜ Gui-yuan¹, LI Wei¹

(1. College of Pharmacy, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China

2. Department of Biology and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310012, China)

Abstract: The elementary fermentation conditions was obtained through a series of single factor tests. Based on the analysis of these results, the optimal culture conditions were confirmed by orthogonal test. The results showed that the optimum conditions are culture temperature 28℃, original pH 7.0, the ratio of strain(+) to strain(-) 1:1, inoculum size 6%, and culture time 156~162 h. On the optimum conditions, the yield of β -carotene increased by 117.3% compared with the original fermentation conditions, up to 772.47 mg/L, which pave the groundwork for future industrialization.

Key words *Blakeslea trispora* β -carotene; biosynthesis; orthogonal design

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)02-0247-05

β -胡萝卜素不仅是 VA 原, 具有预防眼疾、保护视力的功能, 而且还具有抑制细胞变异, 抗癌、防癌、抗氧自由基、增强机体抵抗力, 维护人体上皮组织的正常生理功能, 以及促进儿童生长发育, 美容等一系列重要作用^[1-4], 在世界许多国家被广泛用作食品营养强化剂及添加剂。

根据其来源不同, β -胡萝卜素分为天然与合成两种。采用化学方法合成的 β -胡萝卜素由于不能完全被人体吸收, 并对人体产生一定程度的毒副作用, 长期服用还会对人体产生不可逆转的病变, 因而, 在西方发达国家已被禁止用作食品添加剂。天然提取的 β -胡萝卜素易于被人体吸收, 并具有较好的抗氧化能力, 是目前研究的热点^[5]。

本研究以三孢布拉氏霉菌为生产菌种, 利用一系列单因素试验、正交设计优化 β -胡萝卜素合成的发酵条件, 以期工业化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

三孢布拉氏霉菌(*Blakeslea trispora* zust 1+)、三孢布拉氏霉菌(*Blakeslea trispora* zust 1-) 本实验室保藏。

1.1.2 试剂

β -胡萝卜素标准样品 Fluka 公司; 异烟肼、玉米粉、淀粉、 β -紫罗酮、黄豆粉 市售。

1.1.3 培养基

(1) 斜面培养基(PDA): 马铃薯 200g, 蔗糖(葡萄糖) 20g, 琼脂 15~20g, 水 1000ml, 自然 pH。

(2) 种子培养基(W/V): 黄豆粉 5%, 玉米粉 2.5%, VB₁ 0.005%, pH6.4~6.7。

(3) 发酵培养基: 淀粉 41g/L, 黄豆粉 20g/L, 植物油

收稿日期: 2006-12-29

基金项目: 浙江省科技计划重点资助项目(2006C22050)

作者简介: 戴德慧(1976-), 男, 讲师, 主要从事应用微生物研究。E-mail: daidehui@tom.com

* 通讯作者: 胡伟莲(1971-), 女, 博士, 主要从事生物工程研究。E-mail: weilian89@yahoo.com

35ml/L, 磷酸二氢钾 2g/L, 硫酸镁 1g/L, VB₁ 0.030g/L, 发酵 40~44h 后, 添加 0.05% 的异烟肼 12ml/L 及 10% 的 β -紫罗酮 15ml/L。

1.1.4 仪器设备

SW-CJ-IF 型超净工作台 苏净集团安泰公司; MJX-250B-Z 型霉菌培养箱 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; GX-914MBZ 数显不锈钢鼓风干燥箱 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; BS 224S 型电子天平 北京赛多利斯系统有限公司; UV-2102 PC 型分光光度计 龙尼柯仪器公司; BS-ZEA 型震荡培养箱 国华电器有限公司。

1.2 β -胡萝卜素产量测定方法

1.2.1 标准曲线的绘制

称取 β -胡萝卜素标准品 0.0200g, 取 2ml 三氯甲烷溶解, 再用石油醚定容于 100ml 的容量瓶中, 得到 200.00mg/L 的标准液, 再分别稀释成 0.80、1.20、1.60、2.00、2.40、2.8mg/L 等 6 个梯度, 在 450nm 条件下测定吸光度, 并做线性回归, 绘制标准曲线。得出 $y=0.2866x-0.0223$, 决定系数为 0.9993, 线性关系良好。

1.2.2 β -胡萝卜素含量的测定

发酵液经抽滤, 湿菌体于 45℃ 真空烘干至恒重, 准确称取真空烘干的菌体 0.100g, 并将其放入研钵中, 加入适量石油醚反复研磨至无色为止, 将提取液过滤再用石油醚定容, 在波长 450nm 条件下, 测定吸光度。通过标准曲线计算出 β -胡萝卜素的含量^[6]。

1.2.3 生物量的测定

发酵液经抽滤, 湿菌体于 45℃ 真空烘干至恒重, 称得干重即为生物量^[7]。

1.3 培养方法

将培养 4~5d 斜面正负菌种分别接入到液体种子培养基, 28℃, 200r/min 振荡培养 24~54h, 正负菌种以一定的配比及接种量接入发酵培养基中, 在适宜的温度下, 培养 40~44h 后, 再加入 12ml/L 的 0.05% 异烟肼及 20ml/L 的 10% β -紫罗酮溶液。继续摇瓶发酵至终点。

1.4 单因素试验设计

1.4.1 不同正负菌配比对 β -胡萝卜素产量及发酵生物量的影响

按 6% 的接种量接入经扩大培养的正负菌种, 正负菌种接种比例分别为 15:1、10:1、5:1、1:1、1:5、1:10、1:15 发酵初始 pH7.0, 28℃ 摇瓶培养 120h, 测定发酵的生物量及 β -胡萝卜素。

1.4.2 发酵时间对 β -胡萝卜素产量及发酵生物量的影响

按 6% 的接种量接入经扩大培养的正负菌种, 正负

菌株接种比例为 1:1, 发酵初始 pH7.0, 28℃ 摇瓶培养 192h, 每隔 24h 测定发酵的生物量及 β -胡萝卜素产量。

1.4.3 接种量对 β -胡萝卜素产量及发酵生物量的影响

按 2%、4%、6%、8%、10% 的接种量接入经扩大培养的正负菌种, 正负菌种接种配比为 1:1, 发酵初始 pH7.0, 28℃ 摇瓶培养 144h 后, 测定发酵生物量及 β -胡萝卜素产量。

1.4.4 发酵温度对 β -胡萝卜素产量及发酵生物量影响

按 6% 的接种量接入经扩大培养的正负菌种, 正负菌种接种配比为 1:1, 分别在 24、26、28、30、32、34℃ 等温度条件下, 发酵初始 pH7.0, 摇瓶培养 144h, 测定发酵生物量及 β -胡萝卜素产量。

1.4.5 初始 pH 值对 β -胡萝卜素产量及发酵生物量的影响

按 6% 的接种量接入经扩大培养的正负菌种, 正负菌种接种比例为 1:1, 初始 pH 分别为 4、5、6、7、8、9, 28℃ 摇瓶培养 144h, 测定发酵生物量及 β -胡萝卜素产量。

1.4.6 菌龄对 β -胡萝卜素产量及发酵生物量的影响

按 6% 的接种量接入培养 24、30、36、42、48、54h 的正负菌种, 正负菌种接种比例为 1:1, 初始 pH 分别为 6.5, 28℃ 摇瓶培养 144h, 测定发酵生物量及 β -胡萝卜素产量。

1.5 正交试验设计

根据单因素研究结果, 综合文献报道^[8-9], 三孢布拉氏霉菌发酵温度设定为 28℃, 菌龄为 42h, 对发酵条件中的接种量、正负菌株配比、初始 pH、培养时间等四个因素进行了正交试验, 正交试验因素水平见表 1。

表 1 正交试验因素水平表
Table 1 Levels and factors of orthogonal test

因素	水平		
	1	2	3
接种量(%)	5	6	7
正负菌株配比	2:1	1:1	1:2
初始 pH	6	7	8
培养时间(h)	132	144	156

1.6 最优条件下发酵时间对 β -胡萝卜素的影响

在发酵温度 28℃, 菌龄 42h, 接种量 6%, 菌种配比 1:1, 初始 pH7.0 条件下, 分别测定发酵 144、156、162、168、174、180h 的 β -胡萝卜素的产量。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 不同正负菌配比对 β -胡萝卜素产量及发酵生物量的影响

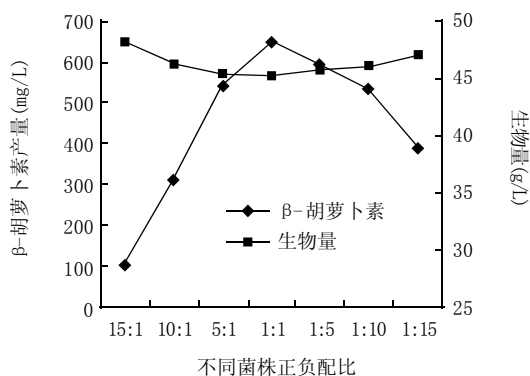


图1 不同正负菌配比对 β -胡萝卜素和生物量的影响

Fig.1 Effects of ratio of strain (+) to strain (-) on β -carotene and biomass

从图1可知,当正、负菌株接种比例为1:1时, β -胡萝卜素发酵产量最高。接种比例过高或过低都不利于 β -胡萝卜素的生成。发酵生物量随着正菌或负菌的比例增大而增大,但差距较小,均在40 g/L以上。

来源不同的“+”、“-”菌在混合培养过程中,菌丝体互相接触,发生原生质与细胞核的结合,生成接合孢子,最后减数分裂形成单倍体的营养体,在此过程中能产生三孢酸,三孢布拉氏霉菌在三孢酸的刺激下,才能大量合成 β -胡萝卜素,提高发酵产率。本研究所采用的菌种,当正负菌接种比例为1:1时产生的三孢酸的量可能刚好促进 β -胡萝卜素的大量合成。

2.1.2 发酵时间对 β -胡萝卜素产量及发酵生物量的影响

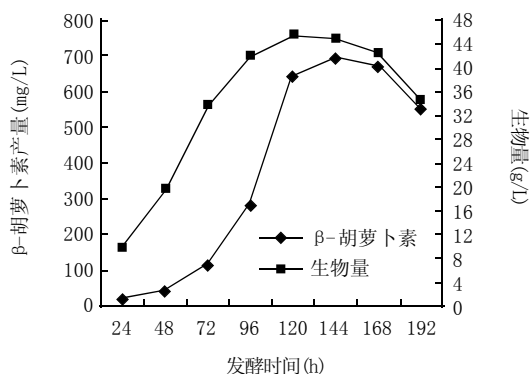


图2 发酵时间对 β -胡萝卜素产量及生物量的影响

Fig.2 Effects of fermentation time on β -carotene and biomass

因种子培养基与发酵培养基成分接近,三孢布拉氏霉菌接种后迅速进入快速生长期,并在96h左右进入生长稳定期,随着培养基营养成分的消耗,144h后菌丝

开始自溶,生物量下降。 β -胡萝卜素是三孢布拉氏霉菌的次级代谢产物,由图3可以看出,在发酵初期72h内, β -胡萝卜素合成速度较慢,在三孢布拉氏霉菌进入生长稳定期开后开始大量合成,在144h时, β -胡萝卜素产量达到最大值。随着菌体的自溶, β -胡萝卜素的合成量减少。综合考虑菌体生长和产物合成趋势,选择144h作为发酵的终点。

2.1.3 接种量对 β -胡萝卜素产量及发酵生物量的影响

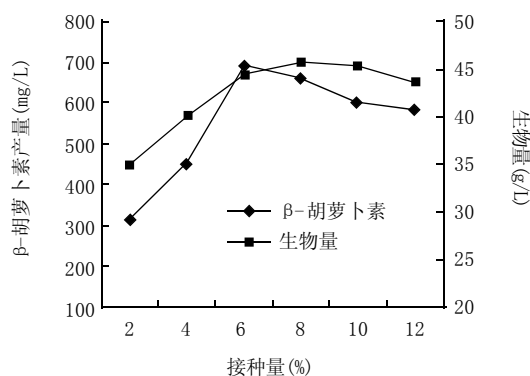


图3 接种量对 β -胡萝卜素产量及生物量的影响

Fig.3 Effects of inoculum size on β -carotene and biomass

由图3可知,随着接种量的增加,发酵生物量不断增加。增加接种量有利于发酵生物量的提高,但接种量超过6%后, β -胡萝卜素合成量明显减少,可能因为接种量过多时,菌体生长过于迅速,生物量增大,使发酵液的物理状态发生改变,黏度增加,影响发酵基质传氧与传质,造成溶解氧的不足,从而使 β -胡萝卜素的产量发生下降。因此,选择6%的接种量为最佳的接种量。

2.1.4 发酵温度对 β -胡萝卜素产量及发酵生物量影响

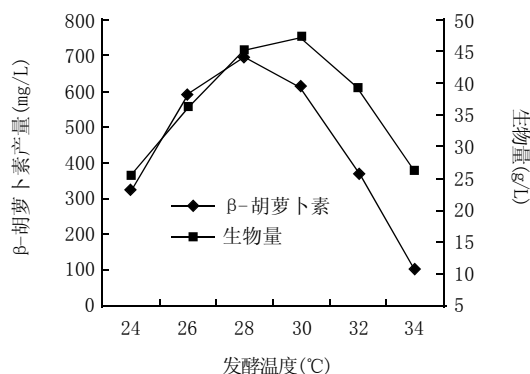


图4 发酵温度对 β -胡萝卜素产量及生物量的影响

Fig.4 Effects of temperature on β -carotene and biomass

温度直接影响微生物的生长繁殖和产物合成,只有在合适的温度条件下,才能保证微生物的生长与代谢。

对同一微生物来说,不同的培养条件、不同的生理生化过程有着不同的最适温度。从图4可知,在28℃时,三孢布拉氏霉菌合成β-胡萝卜素的能力最大,过高过低对β-胡萝卜素的合成都不利,温度升高菌丝生长旺盛,造成培养液中供氧不足,影响发酵产量,同时,由于温度过高,造成菌体过早自溶,影响发酵的生物量及β-胡萝卜素的产量。

2.1.5 初始pH值对β-胡萝卜素产量及发酵生物量的影响

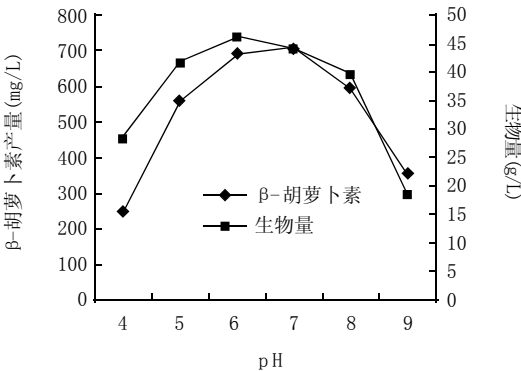


图5 初始pH对β-胡萝卜素产量及生物量的影响
Fig.5 Effects of original pH on β-carotene and biomass

pH是微生物生长和产物合成的重要的状态参数,pH变化会影响各种酶活、菌体对基质的利用速率及细胞的结构,从而影响菌体生长和产物的形成。Seon-Won K^[10]等发现,强碱性作用对β-胡萝卜素生产有利,pH为10是发酵生产的最佳pH;在Fani M^[11]等的研究中,认为最佳的pH在7~8之间;更多的报道认为,最佳pH在6.0~7.0之间。从图5可以看出,本研究采用的三孢布拉氏霉菌的生长最适起始pH在6左右,发酵起始最佳的pH在6~7之间,pH偏酸或偏碱对发酵生物量及β-胡萝卜素合成均不利。

2.1.6 菌龄对β-胡萝卜素产量及发酵生物量的影响

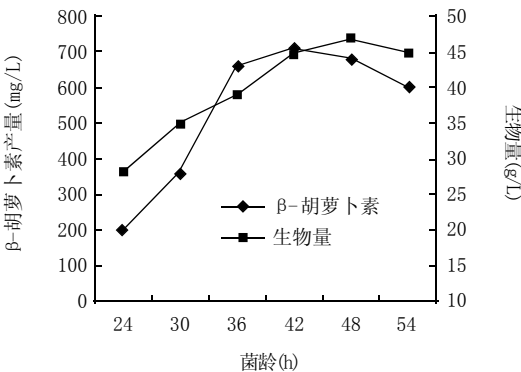


图6 菌龄对β-胡萝卜素产量及生物量的影响
Fig.6 Effects of seed age on β-carotene and biomass

选择适当的接种菌龄十分重要,太年轻或过老的种子对发酵不利,太年轻的种子接种后,产生合成的时间推迟,过老的种子会导致生产能力的下降,菌体过早自溶。由图6可知,种龄为42h左右时,β-胡萝卜素产量最大。

2.2 正交试验确定最佳发酵条件

表2 正交试验设计结果及极差分析
Table 2 Range analysis and results of β-carotene yield by orthogonal test design

序号	接种量 (%)	正负菌株 配比	初始 pH	培养时间 (h)	β-胡萝卜素产量 (mg/L)
1	5	2:1	6	132	531.21
2	5	1:1	7	144	708.33
3	5	1:2	8	156	719.24
4	6	2:1	7	156	694.65
5	6	1:1	8	132	681.57
6	6	1:2	6	144	631.74
7	7	2:1	8	144	665.39
8	7	1:1	6	156	654.48
9	7	1:2	7	132	667.69
K ₁	652.927	630.417	605.810	626.823	
K ₂	669.320	681.460	690.223	668.487	
K ₃	662.520	672.890	688.733	689.457	
R	16.393	51.043	84.413	62.634	

表3 正交试验方差分析表
Table 3 Variance analysis table of orthogonal test

变异来源	df	SS	MS	F _α	显著性
正负菌株配比	2	4482.851	2241.426	11.014	*
初始 pH	2	14004.110	7002.055	34.407	**
培养时间	2	6098.509	3049.255	14.984	*
误差	2	407.01	203.505		
总计	6	24992.48			

注: $F_{0.1}(2, 2)=9$, $F_{0.05}(2, 2)=19$; 在计算过程中,由于接种量的极差($R=16.393$)、均方差($MS=203.505$)相对于其它因素的极差、均方差很小,故对接种量不做方差分析,作为误差项;本试验采用除效应很大的因素以外的部分作为误差项,所以对误差估计偏大,故采用10%和5%两个显著水平,判别标准为: $F > F_{0.05}$, 因素影响高度显著,记为**, $F_{0.1} < F < F_{0.05}$, 因素影响显著,记为*。

由表2可知,初始pH的极差最大,次之为发酵时间与菌种配比,最小的为接种量,说明初始pH对β-胡萝卜素的产量影响最大,接种量影响最小,因此初步确定最优发酵条件为发酵时间156h,菌种配比为1:1,初始pH为7.0,接种量为6%。对正交试验结果进行了方差分析。由表3可看出,初始pH对三孢布拉氏霉菌合成β-胡萝卜素的影响极其显著,菌种配比及培养时间合成影响显著。因此,在实验中应主要考虑初始pH、菌种配比及培养时间对β-胡萝卜素合成的影响。从极差的趋势看,延长发酵时间可能会提高发酵单位,所以在最优的发酵条件下需进一步考虑发酵时间对β-胡萝卜素的影响。

2.3 最优条件下发酵时间对 β -胡萝卜素的影响

在发酵温度 28°C 、菌龄42h、接种量6%、菌种配比1:1、初始pH7.0条件下,分别测定发酵144、156、162、168、174、180h的 β -胡萝卜素的产量,其结果见图7。

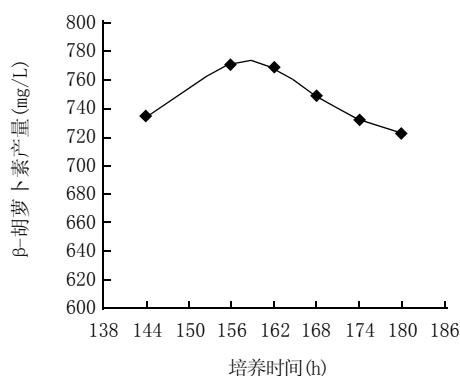


图7 在不同时间胡萝卜素含量变化

Fig.7 Change of β -carotene with culture time

由图7可知,培养时间在156~162h时,三孢布拉氏霉菌胡萝卜素产量最高,达到772.47mg/L,可见经培养条件的优化,能明显提高胡萝卜素的产量。比优化前提高了117%。

3 结 论

3.1 通过一系列单因素试验,初步得到 β -胡萝卜素生产的发酵条件:接种量6%,初始pH 6.5,种龄42h,正负菌配比1:1,培养温度 28°C ,培养时间144h。

3.2 在单因素试验的基础,通过正交优化了发酵条件,结果表明:初始pH对三孢布拉氏霉菌合成 β -胡萝卜素的影响极其显著,菌种配比及培养时间合成影响

显著,正交最优组合为发酵时间156h,菌种配比为1:1,初始pH为7.0,接种量为6%。

3.3 在正交试验优化的基础上,进一步研究了发酵时间对 β -胡萝卜素产量的影响,结果表明:发酵时间为156~162h最佳,在最终的优化发酵条件下, β -胡萝卜素产量达到772.47mg/L,比优化前提高了117%。

参考文献:

- [1] JONKERA D, KUPERA C F, FRAILEB N, et al. Ninety-day oral toxicity study of lycopene from *Blakeslea trispora* in rats[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2003, 37(7): 396-406.
- [2] NOBUO U, YI L, HIDEO E, et al. Photosensitized oxygenation of lycopene[J]. Biosci Biotech Biochem, 1994, 58(9): 1718-1719.
- [3] PATRIZIA R, ANDREW P, ALESSANDRA S, et al. Does tomato consumption effectively increase the resistance of lymphocyte DNA to oxidative damage[J]. Am J nutrition, 1999, 69: 712-718.
- [4] BLOCK G, PATTERSON B, SUBAR A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence[J]. Nutrition Cancer, 1992, 18(1): 1-29.
- [5] 韩磊, 马爱国, 张燕. 补充 β -胡萝卜素对大鼠抗氧化能力及红细胞膜流动性影响的研究[J]. 营养学报, 2005, 27(1): 9-12.
- [6] 陈涛, 何东平. 利用微生物制取 β -胡萝卜素技术的探讨[J]. 武汉食品工业学院学报, 1998, 4(21): 5-8.
- [7] 陈涛, 陈宗胜, 马国华, 等. 三孢布拉氏霉发酵生产 β -胡萝卜素的研究[J]. 微生物通报, 1998, 25(2): 79-82.
- [8] 谭新国, 汪家松, 丁滨, 等. 三孢布拉霉发酵生产 β -胡萝卜素[J]. 中南民族学院学报: 自然科学版, 1997, 16(3): 28-31.
- [9] 徐志强, 余晓斌. Mg^{2+} 对三孢布拉霉合成 β -胡萝卜素的影响[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(3): 104-106.
- [10] SCONE-WON K, WCON-TACK S, YOUNG-HOON P. Increased β -carotene synthesis in *Blakeslea trispora* under strong alkaline culture condition[J]. Biotechnology letters, 1996, 18(11): 1287-1290.
- [11] FANI M, TRIANTAFYLLOS R. Optimization of β -carotene production from synthetic medium by *Blakeslea trispora*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2002, 101: 153-175.