

沼泽红假单胞菌胞内番茄红素生物合成的研究

张 同¹, 朱瑞艳², 惠伯棣^{1,*}, 杨博媛¹

(1.北京联合大学应用文理学院, 北京 100191; 2.河北省生物新能源工程技术研究中心, 河北 秦皇岛 066004)

摘 要: 研究沼泽红假单胞菌中番茄红素的合成积累, 为开发番茄红素的新资源作出尝试。通过HPLC和HPLC-MS分析沼泽红假单胞菌四氢呋喃萃取液, 确认萃取液中所含的主要类胡萝卜素为玫红品、3,4-脱氢玫红品和番茄红素。在补充碳源的条件下, 以种子培养基培养沼泽红假单胞菌, 确定番茄红素在菌群进入对数生长期一段时间后才大量积累, 并在菌群因缺少氮源而进入稳定期后开始下降。这说明番茄红素的合成不仅需要碳源作为前体物, 还需要足够的氮源生成类胡萝卜素合成酶才可以大量积累。通过实验分别确定了沼泽红假单胞菌生产番茄红素的最好碳源、氮源及pH值, 在最好条件下番茄红素的总产量最大值为0.2456μg/mL, 相对产量为0.1682μg/g。

关键词: 番茄红素; 沼泽红假单胞菌; 生物合成; 培养优化

Lycopene Biosynthesis in *Rhodopseudomonas palustris*

ZHANG Tong¹, ZHU Rui-yan², HUI Bo-di^{1,*}, YANG Bo-yuan¹

(1. College of Applied Arts and Science, Beijing Union University, Beijing 100191, China;

2. Hebei New Bio-energy Engineering Research Center, Qinhuangdao 066004, China)

Abstract: This research aims to study the biosynthesis of lycopene in *Rhodopseudomonas palustris* and explore the possibility for *Rhodopseudomonas palustris* to be a novel source of natural lycopene. The metabolic products of *R. palustris* extracted with tetrahydrofuran (THF) were analyzed by HPLC and HPLC-MS. The results showed that the main carotenoids in *R. palustris* were rhodopin, 3,4-dehydrorhodopin and lycopene. *R. palustris* was cultivated in SMN supplemented with carbon source. Massive lycopene accumulation was observed during a period after the beginning of the logarithmic phase, followed by a decline at the stable phase. The optimal carbon source, nitrogen source and pH were determined. Under the optimal cultivation conditions, the yield of lycopene reached a maximum level of 0.2456 μg/mL, and the relative yield was 0.1682 μg/g.

Key words: lycopene; *Rhodopseudomonas palustris*; biosynthesis; culture optimization

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)21-0283-09

doi:10.7506/spkx1002-6630-201321057

番茄红素是胡萝卜素的一种, 广泛地存在于番茄、西瓜、柿子、李子、木瓜、芒果、草莓、柑橘类、杏、和桃以及南瓜、萝卜、胡萝卜等水果蔬菜中^[1]。其中番茄及其制品中的番茄红素含量最高, 且随着番茄成熟度增高其含量也越高^[2]。人体中也含有番茄红素, 其中血液、肾上腺、睾丸、肝脏等器官中含量较高^[3]。

番茄红素的化学式为C₄₀H₅₆, 相对分子质量为536.87, 熔点175℃, 纯品为针状深红色晶体, 带有金属光泽。番茄红素是有机化合物, 可溶于大多数有机试剂, 在卤代烷烃中有很好的溶解度。番茄红素溶液的UV-Vis最大吸收波长因其溶剂不同而略有偏移, 一般在470~475nm之间^[4]。在自然界中, 番茄红素主要是以全反式异构体存在, 在常温过程中储存是稳定的。在光照、热和化学反应的影响下, 全反式异构体会生成顺式

异构体, 成为不稳定的分子。最常见的有13Z、9Z、5Z 3种顺式异构体^[5]。

现在已有大量的证据表明: 番茄红素能够改善胞间隙连接通路丢失这种致癌表现^[6-7]。还有研究证明: 类胡萝卜素可以增加正常细胞和转化细胞之间的连接^[8-9], 而番茄果实中所具有的5,6-环氧番茄红素能增加间隙连接蛋白在人角质层中的表达^[10]。在所有关于番茄红素抗癌的研究中, 预防前列腺癌的研究最多, 其中包含很多流行病学证据^[11-13], 也包含细胞水平上的证据^[14-15]。流行病学研究的结果证明了番茄红素在抑制胃癌方面的正面作用^[16-17]。在动物模型中可以观察到番茄红素对肺癌^[18]和乳腺癌^[19]的抑制作用。目前, 对于番茄红素在消除由运动产生的自由基、抗疲劳方面已有报道^[20]。来自荷兰鹿特丹的一项流行病学研究表明, 在动脉粥样硬化发生

收稿日期: 2012-10-09

作者简介: 张同(1985—), 男, 硕士研究生, 研究方向为生物活性物质制备及生理功能。E-mail: 123king@163.com

*通信作者: 惠伯棣(1959—), 男, 教授, 博士, 研究方向为类胡萝卜素生物化学。E-mail: bodi_hui@ygi.edu.cn

时,番茄红素是重要的保护性因子^[21]。对妇女健康的研究发现,膳食中番茄红素的高摄入可降低65%冠心病的发生率^[22]。对中年男性冠心病人的研究发现,血清中番茄红素水平较低的患者发生急性心肌梗死的危险是其他患者的3.3倍^[23]。

番茄是天然番茄红素的主要来源。从番茄中提取番茄红素的方法主要有溶剂萃取和超临界流体萃取两种方法。但利用微生物发酵生产番茄红素成本低、产量高,且不受生长季节的影响,因此在当前的番茄红素生产中占据一定优势。除此之外罗氏、巴斯夫等跨国大公司还掌握着番茄红素的化学合成工艺。

沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palustris*)属于红螺菌科、红假单胞菌属,在废水处理^[24-26]和水产养殖业中有广泛的应用。沼泽红假单胞菌广泛分布于自然界的土壤、水田、沼泽、湖泊、江海等处,主要分布于水生环境中光线能透射到的缺氧区。对于其生长特点国内外都有研究,但由于菌种不同其结果也不同^[27-31]。国内在利用沼泽红假单胞菌生产番茄红素上也进行了一些研究^[32-35],其中一些研究改进的培养基虽然有明显提高,但价格过于昂贵,不宜大规模使用。同时这些研究中番茄红素的定性研究只使用标准品进行HPLC比对,缺乏其他光谱数据的支持。其计算番茄红素含量的方法都是利用总吸光度进行计算,在萃取液中含有大量其他类胡萝卜素时,这种方法只能估算总类胡萝卜素的含量而不能作为番茄红素含量的计算方法。

本研究的目的是探究沼泽红假单胞菌中番茄红素的合成积累,为将其开发成为番茄红素的新资源做出尝试。在本研究中特别注重了番茄红素组分检测方法的改进,利用标准品在色谱图中的峰面积和对应质量浓度制作标准曲线,以准确的计算出番茄红素全反式异构体的含量。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

菌株:菌株从含有沼泽红假单胞菌的混合液中分离。混合液采集自湖北省黄石地区阳新县网湖,由湖北正佳生物工程股份有限公司提供。该菌液已被大量扩培,用于水产养殖的水质改良剂和饲料。

全反式番茄红素标准品 华北制药集团有限责任公司;乙腈、甲醇、甲基叔丁基醚(MTBE)均为色谱纯迪马科技公司;酵母浸粉 北京奥博星生物技术有限责任公司;大豆蛋白胨、胰酪胨大豆肉汤 北京双旋微生物培养基制品厂;其他试剂均为分析纯。

1.2 培养基

SMN培养基(种子培养基):乳酸钠7.43g/L、氯化铵1g/L、酵母浸粉3g/L、酶水解酪蛋白3g/L、硫酸镁

0.25g/L、氯化钙10g/L、HEFN 10mL/L, pH6.8。其中微量元素储液HEFN:柠檬酸0.4g/L、EDTA 2.0g/L、硼酸0.28g/L、钼酸钠0.1g/L。

1.3 仪器与设备

DHP120型恒温培养箱 上海实验仪器厂有限公司;HZQ-X100型振荡培养箱 哈尔滨东联电子有限公司;多连罐发酵控制系统 镇江格瑞生物工程有限公司;AL204型万分之一天平 梅特勒-托利多(上海)有限公司;MultiSpec-1501型紫外-可见分光光度计 日本Shimadzu公司;1525型HPLC系统(检测器为PDA-996)美国Waters公司。

1.4 方法

1.4.1 全反式番茄红素含量的测定

将全反式番茄红素标准品用二氯甲烷溶解并定容,作为母液避光贮存于4℃,24h内使用。取一定量的母液,用石油醚分别稀释10、20、25、50、100倍,配制成不同质量浓度的全反式番茄红素溶液。测定这些溶液的总吸光度,同时进行HPLC分析,确定其中全反式番茄红素组分的峰面积和百分比。

HPLC分析条件^[36]:固定相:YMC™ Carotenoid Column C₃₀色谱柱(4.6mm×250mm, SOD-5μm);流动相A:乙腈、甲醇体积比3:1;流动相B:甲基叔丁基醚线性梯度洗脱,在10min内由0%B→55%B,10~45min,维持在55%B,45~55min,由55%B→0%B;流速:1mL/min;检测波长:475nm;进样量:20μL;柱温:室温。

番茄红素遇氧、见光均会分解,同时在配制母液时标准品称质量很小。因此本研究通过测定不同质量浓度的全反式番茄红素溶液的总吸光度和HPLC图谱中全反式番茄红素组分的峰面积百分比,用两者的乘积来计算溶液中全反式番茄红素的吸光度,再用公式(1)^[1]来计算出全反式番茄红素的质量浓度。以全反式番茄红素的质量浓度为横坐标,全反式番茄红紫色谱图的峰面积为纵坐标,绘图得到全反式番茄红素组分的回归方程。将其他HPLC分析得到的全反式番茄红素峰面积代入到回归方程中,便可得出对应的全反式番茄红素质量浓度。

$$x/(\text{mg/mL}) = \frac{A \times 1000}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100} \quad (1)$$

式中: x 为样品中所含组分的质量浓度/(mg/mL); A 为样品的组分在471nm波长处的吸光度; $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ 为吸光系数,定义为在1cm光程长的比色杯中1g/100mL溶质的理论吸收值,在此采用3450。

1.4.2 沼泽红假单胞菌的分离、纯化和保存

以SMN为培养基,在厌氧管中接种含有沼泽红假单胞菌的混合液。在30℃,光照厌氧条件下静置培养,直到培养液变为鲜红色,沼泽红假单胞菌大量富集。将培

养液稀释涂布到SMN平板上, 30℃恒温培养。待长出菌落后, 挑取单一菌落在SMN平板上反复稀释涂布和划线确保获得纯净菌种。使用细菌通用引物27F/1492R进行PCR, 扩增菌种的16S rDNA并外送测序。

纯化后的沼泽红假单胞菌在液体SMN中培养24h后加入甘油, 使菌液中的甘油体积分数达到15%, 保存于一80℃冰箱中。使用前将菌种在SMN平板上划线培养72h, 之后挑取单菌落在试管中培养24h作为种子液。

1.4.3 类胡萝卜素种类的鉴定

在SMN中培养沼泽红假单胞菌96h, 培养条件为30℃, 避光, 转速100r/min。取一定量的发酵液离心去除上清后用有机试剂萃取色素, 用HPLC分析萃取液并外送样品进行HPLC-MS分析, 同时以番茄红素标准品作为对照进行HPLC分析。HPLC条件同1.4.1节, HPLC-MS条件如下。

MS条件: LCQ Deca XP离子阱质谱仪, 离子源喷射, 电压315kV, 毛细管温度275℃, 夹套气(N₂), 检测方式为正离子检测; HPLC条件: 由于外送质谱检测只能使用单泵系统, 因此其流动相为HPLC分析改进的单一流动相, 其他条件不变; 固定相: YMCTM Carotenoid Column C₃₀色谱柱(4.6mm×250mm, SOD-5μm); 流动相: 将HPLC分析中的流动相A(乙腈、甲醇体积比3:1)与流动相B(甲基叔丁基醚, MTBE)按照体积比55:45混合; 流速: 1mL/min; 检测波长475nm; 进样量: 10μL; 柱温: 室温。

1.4.4 沼泽红假单胞菌在SMN中的生长规律

在5L发酵罐中以SMN培养沼泽红假单胞菌。培养条件: 培养基3L, 接种量10%, 避光, 空气通入量为2L/min, 转速150r/min, 温度30℃。当发酵液pH值上升到7.5后, 以乳酸作为补料剂, 使发酵液pH值维持在7.5左右。发酵期间每6h取少量发酵液分析, 以水为空白参比, 测定600nm波长处菌液吸光度。一定体积的发酵液, 离心去上清, 置于105℃电热鼓风箱中烘干至恒质量, 称量并计算菌体生物量(g/L)。将0、24、48、72、96h这5个时间点的发酵液离心去除上清后用有机试剂萃取色素, 用HPLC分析萃取液(HPLC条件同1.4.1节)。

1.4.5 番茄红素产量的优化

1.4.5.1 碳源、氮源优化

以SMN培养基为基础, 将碳源分别替换为结晶乙酸钠、柠檬酸钠、草酸、酒石酸、葡萄糖、麦芽糖和可溶性淀粉, 使其用量相当于7.52g/L的乳酸钠; 无机氮源不变, 有机氮源只使用酵母浸粉且用量为2g/L。培养条件: 接种量10%, 恒温30℃, 转速100r/min, 避光。培养72h后测定菌体生物量与全反式番茄红素的HPLC峰面积(HPLC条件同1.4.1节), 通过计算确定最佳碳源。

以SMN培养基为基础, 使用最佳碳源, 无机氮源不

变, 有机氮源只使用一种, 分别为酵母浸粉2g/L、酶解酪蛋白1.64g/L、大豆蛋白胨2.25g/L、胰蛋白胨1.5g/L、胰酪胨大豆肉汤2.2g/L, 使用量相当于2g酵母浸粉中所含氮量。条件不变培养72h, 测定菌体生物量与全反式番茄红素的HPLC峰面积, 通过计算确定最佳氮源。

以SMN培养基为基础, 使用最佳碳源和有机氮源, 以两者含量和装液量为因素, 选取不同水平配制培养基。其他条件不变, 培养72h, 测定菌体生物量与全反式番茄红素的HPLC峰面积, 通过计算确定生产全反式番茄红素最佳培养基。

1.4.5.2 积累番茄红素最佳pH值

利用最佳培养基培养沼泽红假单胞菌, 条件同1.4.5.1节。前24h为保证菌群生长, 使菌群顺利度过延滞期, 不改变pH值。24h之后用酸度计准确测量pH值并分别加入盐酸或氢氧化钠, 使各组发酵液pH值分别调整为6、7、8、9、10, 保持其他培养条件不变继续培养30h。每6h取样进行HPLC分析得到全反式番茄红素峰面积(HPLC条件同1.4.1节), 通过计算确定最佳pH值。

1.4.5.3 发酵罐优化生产番茄红素

在5L发酵罐中以优化培养基培养沼泽红假单胞菌。培养条件: 培养基3.5L、接种量10%、避光、空气通入量1L/min、转速150r/min、恒温30℃。当发酵液pH值上升到产番茄红素最佳值后, 以最佳碳源作为补料剂, 使发酵液pH值维持稳定。每6h取少量发酵液测定吸光度、生物量。将0、24、48、72、96、120h这6个时间点的发酵液进行HPLC分析得到全反式番茄红素峰面积(HPLC条件同1.4.1节), 通过计算确定番茄红素的产量。

2 结果与分析

2.1 全反式番茄红素含量的测定

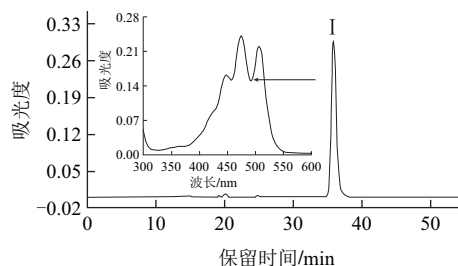


图1 全反式番茄红素的HPLC色图谱及其电子吸收光谱
Fig.1 Chromatogram and electronic absorption spectrum of all-E-lycopenes by C₃₀-HPLC

由图1可知, 在此种色谱条件下, 全反式番茄红素标准品保留时间为36.11min。由电子吸收光谱图可知, 其三指峰的 λ_{\max} 分别为447、473nm和506nm。将全反式番茄红素的质量浓度和全反式番茄红素色谱图的峰面积绘图(图2),

得到回归方程: $y = 267.9x (R^2 = 0.997)$ 。其中 y 表示不同质量浓度的全反式番茄红素在此HPLC系统绘制的色谱图中所占的面积, x 表示全反式番茄红素质量浓度。按信噪比为2测定检出下限为: $0.0747 \mu\text{g/mL}$ 。

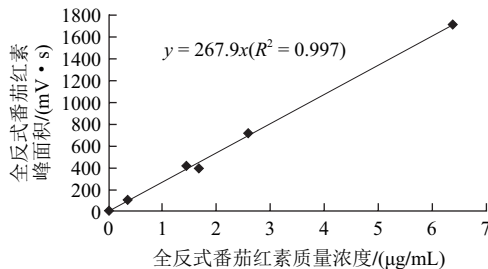


图2 全反式番茄红素异构体组分的质量浓度与其峰面积的线性回归
Fig.2 Linear correlation between mass concentration of all-*E*-lycopen and corresponding peak area

2.2 沼泽红假单胞菌的分离、纯化及其中类胡萝卜素的种类鉴定

按1.4.2节所述方法, 得到纯化菌种的形态为杆状到长卵形, 稍弯; 培养物呈红到暗红色; 菌斑没有褶皱, 与《伯杰氏细菌手册》描述一致。经琼脂糖凝胶进行电泳验证, 扩增出的16S rDNA在1000~2000bp之间。测序结果与NCBI上的数据比较, 与其最匹配的菌为*Rhodopseudomonas palustris* TIE-1, 匹配程度为98%。

培养96h的发酵液离心去除上清后用有机试剂萃取菌泥中的色素。通过使用丙酮和四氢呋喃这两种有机溶剂测试萃取效果, 发现使用四氢呋喃振荡萃取一次可完全提取色素, 而丙酮萃取则需要反复研磨多次。其原因应该这是由于四氢呋喃可以轻易破坏沼泽红假单胞菌细胞膜, 而丙酮无此效果。通过HPLC测试, 使用两种有机溶剂提取的色素组成基本相同。因此为了避免类萃取时胡萝卜素的损耗, 之后的实验使用四氢呋喃作为萃取剂。

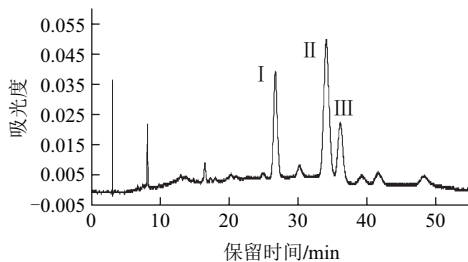


图3 沼泽红假单胞菌四氢呋喃提取液的 C_{30} -HPLC色谱图
Fig.3 Chromatogram of THF extractable fractions of *R. palustris* by C_{30} -HPLC

用HPLC分析沼泽红假单胞菌的四氢呋喃萃取液, 得到色谱图(图3, 检测波长475nm), 萃取液至少有14种组分。其中, 保留时间分别为26.75、34.15min和36.08min的3个组分的峰面积最大, 分别记为组分 I、II、III。通过观察3种组分的电子吸收光谱(图4), 其在300~650nm

之间都具有三指特征吸收峰, 说明这3个组分都是类胡萝卜素。组分III的保留时间与电子吸收光谱都和全反式番茄红素标准品极为相似, 可能是全反式番茄红素。

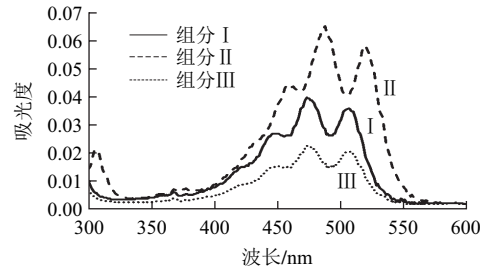


图4 组分 I、II、III的电子吸收光谱
Fig.4 Electronic absorption spectra of components I, II and III

将萃取液外送进行HPLC-MS分析, 其色谱图如图5所示(检测波长475nm)。虽然由于条件变化, 图5中标注的 I、II 和III这3种组分在保留时间上要早于与图3中的3种组分, 但其出峰顺序没有改变。可以判定, 图5中标注3种组分与图3中所标注的3种组分是一一对应的。

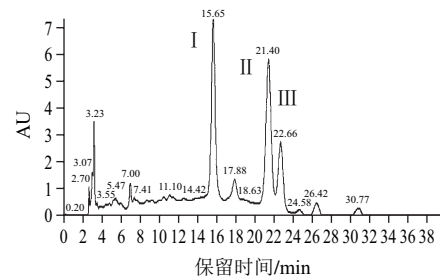
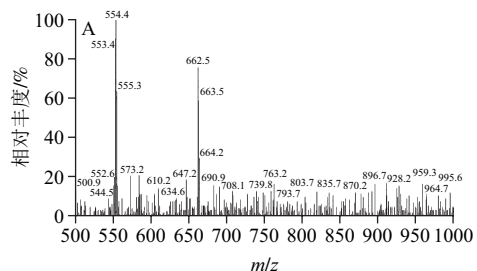


图5 *R. palustris*四氢呋喃提取液的 C_{30} -HPLC-MS色谱图
Fig.5 Chromatogram of THF extractable fractions of *R. palustris* by C_{30} -HPLC-MS

由图5可知, 组分 I 的保留时间为15.65min, 在其保留时间附近提取的一级质谱图(图6)显示此组分中含最多的物质分子质量为554.4D。而质荷比(m/z)为554的离子流图显示, 分子质量为554D的物质保留时间为15.84min, 与色谱图中组分 I 的保留时间基本一致。可以判断组分 I 的分子质量为554.4D。同样可以判断组分 II 的分子质量为552.3D(图7), 组分III的分子质量为536.4D(图8)。



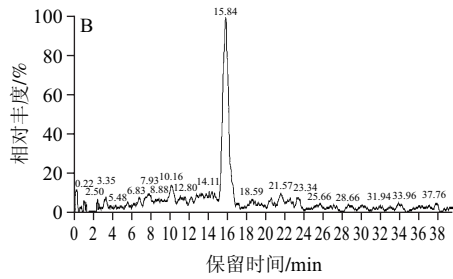


图6 组分I的一级质谱图(A)和提取离子流图(B)

Fig.6 Primary mass spectrum (A) and extracted ion current chromatogram (B) of component I

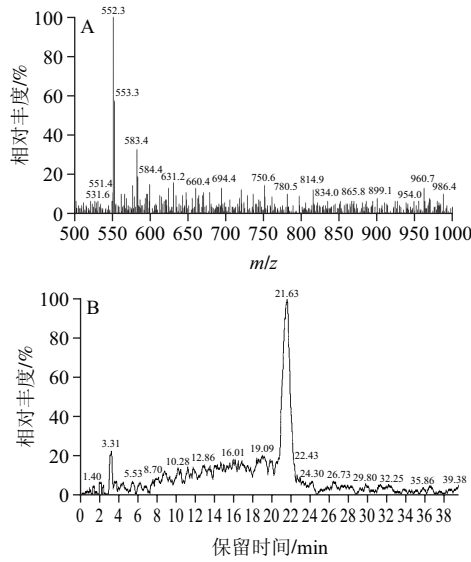


图7 组分II的一级质谱图(A)和提取离子流图(B)

Fig.7 Primary mass spectrum (A) and extracted ion current chromatogram (B) of component II

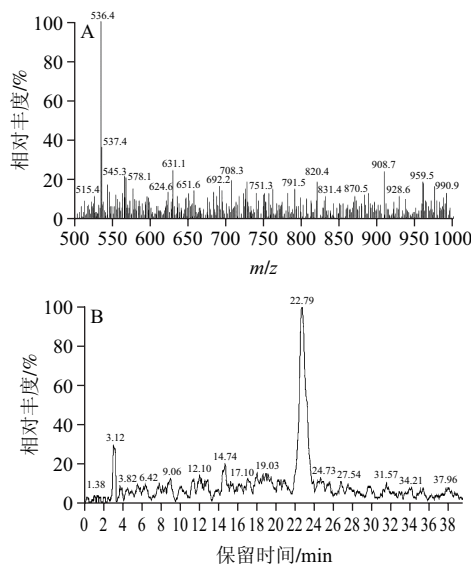


图8 组分III的一级质谱图(A)和提取离子流图(B)

Fig.8 Primary mass spectrum (A) and extracted ion current chromatogram (B) of component III

利用HPLC-MS分析得出的各组分分子质量, 在Lipidbank上通过限定分子质量大小进行搜索, 得到分子质量相似物质的光谱特征吸收波长。同时以沼泽红假单胞菌TIE-1为参照在KEGG上检索, 得到其类胡萝卜素的代谢过程(图9)。通过分子质量、特征光谱、合成途径3种方式对比可以推断出, 沼泽红假单胞菌中色素的3种主要的组分为玫红品(rhodopin)、3,4-脱氢玫红品(3,4-dehydrorhodopin)和番茄红素(lycopene)(表1)。

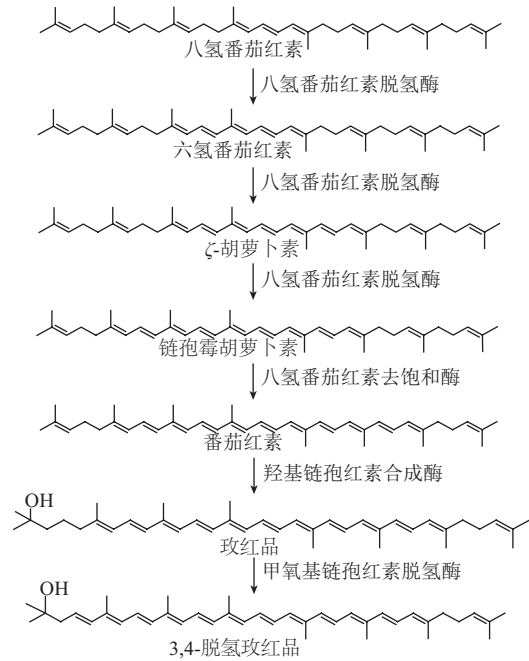


图9 沼泽红假单胞菌主要类胡萝卜素的代谢过程

Fig.9 Metabolic pathways of the major carotenoids in *R. palustris*

在这3种类胡萝卜素中, 3,4-脱氢玫红品含量最多, 这与Mizoguchi等^[37]的研究结论是一致的。玫红品的含量次之, 其在多种光合细菌中都有发现^[38-39]。玫红品的共轭双键为 $n=11$, 主要存在于光合膜中的外周捕光天线(LH2)^[40]。在外周捕光天线中, 类胡萝卜素的主要功能是捕获光能, 并通过单线态-单线态能量传递将激发能传递给临近的细菌叶绿素分子。

表1 *R. palustris*中3种主要类胡萝卜素与可能物的特征值

Table 1 Chromatographic and spectral characteristics of three major carotenoids and unknown fractions from *R. palustris*

组分	组分分子质量/D	最大吸收波长/nm	推断物质	推断物质分子质量/D	推断物质最大吸收波长/nm
I	554.4	449, 475, 505	玫红品	554.888	447, 474, 505
II	552.3	459, 487, 519	3,4-脱氢玫红品	552.872	459, 486, 520
III	536.4	449, 473, 504	番茄红素	536.873	447, 473, 504

2.3 沼泽红假单胞菌的生长规律

2.3.1 菌群生长规律

按1.4.4节中方法在发酵罐中培养沼泽红假单胞菌

96h, 每6h取样测定吸光度和菌体生物量。将吸光度和菌体生物量分别与培养时间作图得到吸光度生长曲线和菌体生物量生长曲线(图10)。由于除了菌群密度可以影响菌液吸光度外, 单个菌的形态、大小也会影响其数值变化。因此菌群进入延滞期的时间应使用生物量生长曲线的数据来确定, 即60h时菌群生长进入延滞期。

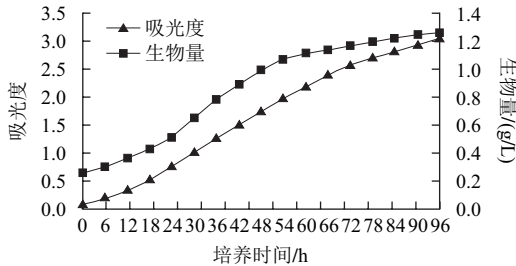


图10 沼泽红假单胞菌在种子培养基中的生长曲线

Fig.10 Growth curve of *R. palustris* in seed medium

由图10可知, 在60h菌群进入稳定期时, 发酵液的吸光度为2.165, 生物量为1.111g/L, 菌群总量并不多, 这说明此时菌群进入稳定期的原因不是因菌群密度过大所致, 而是由于发酵液中的氮或磷在60h左右基本被菌群完全利用, 菌群无法大量扩增。由于此时菌群还可以利用碳源, 且磷可以重复利用, 细菌可以继续积累物质, 致使外形改变。因此菌群的生物量仍然在缓慢增加, 而吸光度上升较快。

2.3.2 3种主要类胡萝卜素积累规律

用HPLC分析0、24、48、72、96h这5个时间点的发酵液, 将色谱图中番茄红素的峰面积代入到全反式番茄红素线性回归方程 $y=267.9x(R^2=0.997)$ 中, 得出萃取液中番茄红素的质量浓度, 之后除以浓缩倍数得到发酵液中番茄红素的质量浓度($\mu\text{g/mL}$)。将质量浓度与菌体生物量相比得到全反式番茄红素相对产量($\mu\text{g/g}$)。将质量浓度和相对产量分别与培养时间作图得到两条番茄红素积累曲线(图11)。将玫红品和3,4-脱氢玫红品的峰面积分别与菌体生物量相比, 得到其相对积累比值。将两种类胡萝卜素的峰面积和相对积累比值分别与培养时间作图, 得到玫红品和3,4-脱氢玫红品的积累曲线(图12、13)。

在菌群进入稳定期前, 3种主要类胡萝卜素有如下规律: 番茄红素在菌群进入对数生长期后进入高速积累期, 而玫红品和3,4-脱氢玫红品则基本随着菌群进入对数生长期而进入高速积累期。这说明玫红品和3,4-脱氢玫红品的合成与菌体的高速生长有内在的联系, 且其可以对自身的合成造成负反馈调节。而番茄红素作为玫红品和3,4-脱氢玫红品的前体, 只有在两者积累到一定程度后才可以大量积累, 且3,4-脱氢玫红品的消耗可以刺激番茄红素的合成增加。

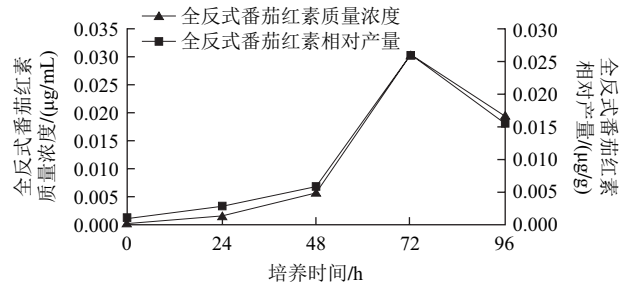


图11 沼泽红假单胞菌在SMN培养基中全反式番茄红素积累曲线

Fig.11 Accumulation curve of all-*E*-lycopene from *R. palustris* in SMN medium

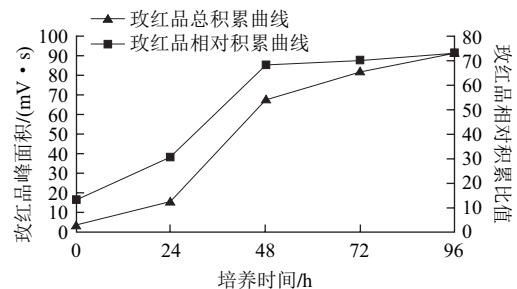


图12 沼泽红假单胞菌在SMN培养基中玫红品积累曲线

Fig.12 Accumulation curve of rhodopin from *R. palustris* in SMN medium

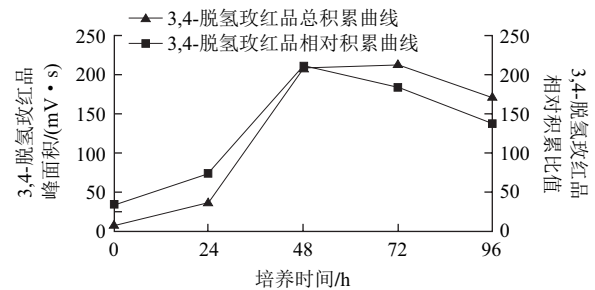


图13 沼泽红假单胞菌在SMN培养基中3,4-脱氢玫红品积累曲线

Fig.13 Accumulation curve of 3,4-dehydrorhodopin from *R. palustris* in SMN medium

在菌群进入稳定期后, 3种主要类胡萝卜素有如下规律: 番茄红素和3,4-脱氢玫红品的积累开始下降; 玫红品的积累开始平稳。这说明, 当沼泽红假单胞菌的生长由于缺乏氮或磷而进入稳定期后, 各种合成酶的含量并没有大幅下降(玫红品含量稳定), 但可循环利用的辅酶II总量不足。由于类胡萝卜素为次生代谢产物, 投入到合成类胡萝卜素的辅酶II数量开始减少, 进而使需要辅酶II辅助脱氢才能形成的番茄红素和3,4-脱氢玫红品含量开始下降。而玫红品合成会消耗番茄红素, 且生成番茄红素的过程需要更多辅酶II(从番茄红素起4次脱氢), 因此番茄红素含量下降的速率要远大于3,4-脱氢玫红品(从番茄红素开始只有1次脱氢)。同时也可由此反向推论: 当番

茄红素和3,4-脱氢玫瑰红素的积累曲线开始下降,说明沼泽红假单胞菌的生长在此之前已经进入因缺少氮或磷所造成的平稳期。

可以看出,若想利用发酵大量富集番茄红素,应在菌群进入稳定期一段时间后及时停止发酵,防止已经积累的番茄红素被菌群代谢利用。

2.4 全反式番茄红素产量的优化

2.4.1 碳源、氮源优化

表2 改变碳源对*R. palustris*生产的影响

Table 2 Effect of carbon source on lycopene biosynthesis and dry mycelia weight in *R. palustris*

碳源	添加量/(g/L)	菌体生物量/(g/L)	番茄红素质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)
结晶乙酸钠	7.43	1.5722	0.110
草酸	8.12	0.3389	—
柠檬酸三钠	5.81	0.3000	—
乳酸钠	7.52	0.6222	0.007
酒石酸	4.48	0.6833	—
苹果酸	3.58	0.5889	—
葡萄糖	3.58	0.5444	—
麦芽糖	3.22	0.5389	—
可溶性淀粉	4.00	絮状沉淀无法测定	—

注:—,过小无法测定。

按1.4.5.1节方法改变碳源,培养沼泽红假单胞菌72h后取样分析,测定菌体生物量及番茄红素的质量浓度,结果如表2所示,使用乙酸钠的菌体生物量和番茄红素峰面积都是最大的。因此选用乙酸钠作为生产番茄红素的培养基的碳源。

确定乙酸钠作为碳源后,改变培养基氮源,培养沼泽红假单胞菌72h后取样分析。测定菌体生物量及番茄红素的质量浓度,结果如表3所示,使用酵母浸粉的菌体生物量和番茄红素峰面积都是最大的。因此选用酵母浸粉作为生产番茄红素的培养基的氮源。

表3 改变氮源对*R. palustris*生产的影响

Table 3 Effect of nitrogen source on lycopene biosynthesis and dry mycelia weight in *R. palustris*

氮源种类	添加量/(g/L)	菌体生物量/(g/L)	番茄红素质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)
酵母浸粉	2.00	1.55	0.0784
酶解酪蛋白	1.64	0.5833	—
大豆蛋白胨	2.25	1.4778	0.0532
胰蛋白胨	1.50	0.6611	—
胰酪胨大豆肉汤	2.20	0.8722	—

注:—,无法测定。

使用乙酸钠作为碳源,酵母浸粉作为氮源,培养沼泽红假单胞菌72h后取样分析。对各组的菌体生物量和番茄红素质量浓度进行正交分析,结果如表4所示,生产番茄红素与菌体生物量的最佳条件都是第9组。可确定沼泽红假单胞菌生产番茄红素的优化培养基配方为:结晶乙酸钠9.74g/L、氯化铵1g/L、酵母浸粉3g/L、硫酸镁0.25g/L、

氯化钙10mL(10g/L)、HEFN 10mL/L、磷酸缓冲液(2mol/L) 10mL/L,初始pH6.8。

表4 菌体生物量与番茄红素质量浓度为指标的正交试验设计及结果

Table 4 Orthogonal array design and results for optimal lycopene biosynthesis and dry mycelia weight

试验号	结晶乙酸钠添加量/(g/L)	酵母粉添加量/(g/L)	装液量/mL	菌体生物量/(g/L)	番茄红素质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)
1	6.50	1	40	0.95	0.915
2	6.50	2	50	1.00	18.309
3	6.50	3	60	1.34	62.541
4	8.12	1	50	1.05	4.778
5	8.12	2	60	1.26	61.534
6	8.12	3	40	1.45	45.166
7	9.74	1	60	1.09	2.370
8	9.74	2	40	1.18	12.700
9	9.74	3	50	1.59	69.093
菌体生物量	k_1	1.0963	1.0315	1.1944	
	k_2	1.2519	1.1463	1.2148	
	k_3	1.2907	1.4611	1.2296	
	R	0.1944	0.3148	0.0352	
番茄红素质量浓度	k_1	27.06	16.95	21.61	
	k_2	36.10	20.88	30.73	
	k_3	38.87	64.39	49.89	
	R	11.62	43.51	28.29	

2.4.2 积累番茄红素最佳pH值

按1.4.5.2节方法用优化配方培养沼泽红假单胞菌,用HPLC测定改变pH值后的全反式番茄红素峰面积。计算出番茄红素质量浓度,用其与培养时间作图(图14),可以确定沼泽红假单胞菌在加入酸碱12h后(总培养36h),除pH10组以外,其他各组都已摆脱酸碱的影响。在pH值有影响的时间范围内,pH8组的番茄红素积累速率最快,因此确定发酵最优pH值为8。

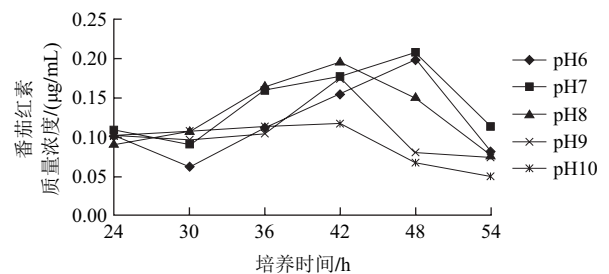


图14 pH值对番茄红素积累的影响

Fig.14 Effect of pH on the accumulation of lycopene

2.4.3 发酵罐优化生产番茄红素

按1.4.5.3节方法培养沼泽红假单胞菌120h并分析。分别测定吸光度、菌体生物量并绘制生长曲线(图15)。菌群在12h左右进入对数生长期。在30h左右因补料,培养液pH值固定在8左右,此后菌群的生长速率基本恒定,且没有出现明显进入平稳期的迹象。用HPLC分析发酵液,绘制番茄红素积累曲线(图16)。其中番茄红素总产量最大值为0.2456 $\mu\text{g/mL}$,相对产量最大值为0.1682 $\mu\text{g/g}$ 。

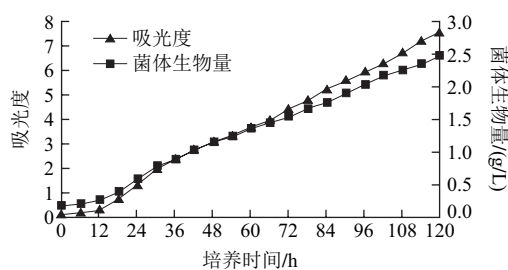


图15 沼泽红假单胞菌优化培养基生长曲线

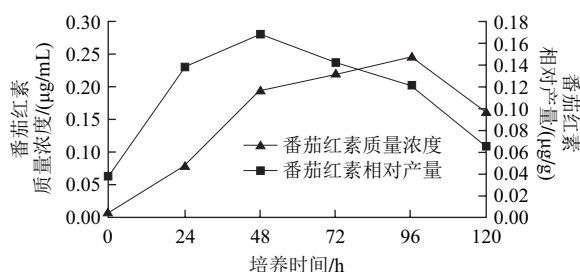
Fig.15 Growth curve of *R. palustris* in optimal medium

图16 沼泽红假单胞菌优化培养基番茄红素积累曲线

Fig.16 Accumulation of lycopene in *R. palustris* in optimal medium

根据2.3节得出的推论,当番茄红素相对产量开始下降,说明发酵液中的氮或磷已在此之前被消耗完,且菌群的生长也在此之前进入平稳期。但图16中并未明显表明菌群生长进入平稳期。这说明沼泽红假单胞菌即使在没有充足氮或磷的情况下,仍然可以高效的利用乙酸钠并将其转化为自身物质,但积累产物并不是类胡萝卜素。因此为了收集番茄红素,培养时间应控制在96h左右。

3 结论

沼泽红假单胞菌主要积累3种类胡萝卜素,分别是玫红品、3,4-脱氢玫红品和番茄红素。在发酵过程中的积累情况为:番茄红素在菌群进入对数生长期后进入高速积累期,并在稳定期开始下降;玫红品随着菌群进入对数生长期进入高速积累期,并从稳定期开始平稳;3,4-脱氢玫红品随着菌群进入对数生长期进入高速积累期,并从稳定期起开始下降。

沼泽红假单胞菌生产番茄红素的优化培养基配方为:结晶乙酸钠9.74g/L、氯化铵1g/L、酵母浸粉3g/L、硫酸镁0.25g/L、氯化钙10mL(10g/L)、HEFN 10mL/L、磷酸盐缓冲液10mL(2mol/L),初始pH6.8。优化培养条件为:接种量10%、转速150r/min、温度30℃、通气量1L/min,避光,pH值上升到8时用乙酸补料使pH值维持在8左右,发酵时间96h左右。在此条件下番茄红素总产量达到最大值0.2456μg/mL,相对产量为0.1682μg/g。

参考文献:

- [1] 张同,赵婷,惠伯棣.类胡萝卜素在食物中的分布[J].食品科学,2010,31(17):487-492.
- [2] 王海廷.中国番茄[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,2001:120-122.
- [3] RAO A V, AGARWAL S. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases[J]. Nutrition Research, 1999, 19(2): 305-323.
- [4] 惠伯棣.类胡萝卜素化学与生物化学[M].北京:中国轻工业出版社,2005.
- [5] 刘沐霖,惠伯棣,庞善春.番茄红素人工合成与天然产物的鉴定[J].食品科学,2007,28(9):462-466.
- [6] 李京,惠伯棣.几何异构化对番茄红素淬灭单线态氧功能的影响[J].食品科学,2007,28(8):104-107.
- [7] KING T J, BERTRAM J S. Connexins as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2005, 1719(1/2): 146-160.
- [8] BERTRAM J S, VINE A L. Cancer prevention by retinoids and carotenoids: independent action on a common target[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2005, 1740: 170-178.
- [9] NAVES M M, SILVEIRA E R, DAQLI M L, et al. Effects of β -carotene and vitamin A on oval cell proliferation and connexin 43 expression during hepatic differentiation in the rat[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2001, 12: 685-692.
- [10] KHACIK F, BEECHER G R, SMITH J C. Lutein, lycopene and their oxidative metabolites in chemoprevention of cancer[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 1995, 59(Suppl 22): 236-246.
- [11] MILLS P K, BEESON W L, PHILLIPS R L, et al. Cohort study of diet, lifestyle and prostate cancer in adventist men[J]. Cancer, 1989, 64: 598-604.
- [12] GIOVANNUCCI E, ASCHERIO A, RIMM E B, et al. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer[J]. Journal of the National Cancer Institute, 1995, 87(23): 1767-1776.
- [13] VAISHAMPAYAN U, HUSSAIN M, BANERJEE M, et al. Lycopene and soyisoflavones in the treatment of prostate cancer[J]. Nutrition and Cancer, 2007, 59(1): 1-7.
- [14] PASTORI M, PFANDE H, BOSCOBOINIK D, et al. Lycopene in association with alpha-tocopherol inhibits at physiological concentrations proliferation of prostate carcinoma cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, 250(3): 582-585.
- [15] 王爱红,张立实.番茄红素对前列腺癌细胞PC-3增殖和细胞周期的影响[J].卫生研究,2007,36(5):575-577.
- [16] FRANCESCHI S, BIDOLI E M, la VECCHIA C, et al. Tomatoes and risk of digestive-tract cancers[J]. International Journal of Cancer, 1994, 59: 181-184.
- [17] GERSTER H. The potential role of lycopene for human health[J]. Journal of the American College of Nutrition, 1997, 16: 109-126.
- [18] KIM D J, TAKASUKA N, KIM J M, et al. Chemoprevention by lycopene of mouse lung neoplasia after combined initiation treatment with DEN, MNU and DMH[J]. Cancer Letters, 1997, 120: 15-22.
- [19] SHARONI Y, GIRON E, RISE M, et al. Effects of lycopene-enriched tomato oleoresin on 7,12-dimethyl-benz[a]anthracene-induced rat mammary tumors[J]. Cancer Detection and Prevention, 1997, 21: 118-123.
- [20] 吴丽君,郭新明,张俊峰.番茄红素及运动对人体血清自由基代谢的影响[J].体育科学,2008,28(2):47-53.
- [21] KLIPSTEIN-GROBUSCH K, LAUNER L J, GELEIJNSE J M, et al. Serum carotenoids and atherosclerosis: the Rotterdam study[J].

- Atherosclerosis, 2000, 148: 49-56.
- [22] SESSO H D, LIU S, GAZIANO J M, et al. Dietary lycopene, tomato-based food products and cardiovascular disease in women[J]. The Journal of Nutrition, 2003, 133: 2336-2341.
- [23] RISSANEN T, VOUTILAINEN S, NYSSONEN K, et al. Lycopene, atherosclerosis and coronary heart disease[J]. Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.), 2002, 227: 900-907.
- [24] 冯波, 赵红卫, 张迅, 等. 高活性沼泽红假单胞菌分离及对垃圾渗滤液处理的研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(24): 13322-13324.
- [25] 马杰, 吕跃钢, 何亚明. 光合细菌处理豆制品废水影响因素的探讨[J]. 北京轻工业学院学报, 2000, 18(1): 5-9.
- [26] 周茂洪, 赵肖为, 吴雪昌. 光合细菌沼泽红假单胞菌同化磷能力的研究[J]. 科技通报, 2002, 18(2): 142-146.
- [27] PIETRO C, ANGELO S. Biomass production and studies on *Rhodospseudomonas palustris* grown in an outdoor, temperature controlled, underwater tubular photobioreactor[J]. Journal of Biotechnology, 2001, 88(3): 239-249.
- [28] 张新英, 莫天砚, 刘斌. 红假单胞菌的生理学特性研究[J]. 广西师范学院学报: 自然科学版, 2001, 19(1): 74-78.
- [29] 梁丽琨, 鞠宝, 郭承华. 深层液体培养法生产沼泽红假单胞菌[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(5): 9-11.
- [30] 蔡慧农, 倪辉, 苏文金. 沼泽红假单胞菌培养基的优化及降氮氮作用的研究[J]. 集美大学学报: 自然科学版, 2007, 12(3): 198-203.
- [31] 夏兵兵, 康建平, 苏波, 等. 沼泽红假单胞菌发酵条件的响应面优化研究[J]. 食品与发酵科技, 2010, 46(4): 29-35.
- [32] 肖念平, 乔香莲. 培养基组成对光合细菌产生类胡萝卜素的影响[J]. 大连民族学院学报, 2002, 4(3): 39-42.
- [33] 崔战利, 陈锡时. 采用均匀设计方法提高光合细菌菌体类胡萝卜素含量的研究[J]. 常德师范学院学报: 自然科学版, 2000, 12(2): 72-74.
- [34] 李福枝, 刘飞, 江南. 沼泽红假单胞菌产类胡萝卜素培养条件的优化研究[J]. 食品与机械, 2007, 23(1): 54-57.
- [35] 包有霞, 陈碧霄, 闫震. 沼泽红假单胞菌的培养和生产番茄红素的优化控制[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(5): 693-697.
- [36] 惠伯棣, 李京, 孙拿拿, 等. 番茄和胡萝卜中类胡萝卜素的C₃₀与C₁₈ HPLC分离[J]. 中国食品卫生杂志, 2006, 18(4): 289-292.
- [37] MIZOGUCHI T, ISAJI M, HARADA J. Identification of 3,4-didehydrorhodopin as major carotenoid in *Rhodospseudomonas* species[J]. Photochemical & Photobiological Sciences, 2008, 7(4): 492-497.
- [38] THEISS C, LEUPOLD D, MOSKALENKO A A, et al. Femtosecond spectroscopy of native and carotenoidless purple-bacterial LH2 clarifies functions of carotenoids[J]. Biophysical Journal, 2008, 94(12): 4808-4811.
- [39] NIEDZWIEDZKI D M, FUCIMAN M, KOBAYASHI M, et al. Ultrafast time-resolved spectroscopy of the light-harvesting complex 2 (LH2) from the photosynthetic bacterium *Thermochromatium tepidum*[J]. Photosynthesis Research, 2011, 110(1): 49-60.
- [40] 冯娟, 李雪峰, 刘渊. 紫色光合细菌中类胡萝卜素的选择性分布及功能[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(7): 1459-1463.