

影响 β -胡萝卜素降解菌酶活性因素的研究

王树林¹, 朱明明², 李 婧³, 左伟平¹

(1.青海大学农牧学院, 青海 西宁 810016; 2.西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100;

3.河南农业大学食品科学技术学院, 河南 郑州 450002)

摘 要: 采用单因素试验和响应面分析法对影响 β -胡萝卜素降解菌粗酶液酶活的主要因素进行优化, 建立主要试验因素与响应值之间的函数关系, 并筛选得到影响酶活性的主要培养基组成及最优培养条件, 主要培养基组成为: 蔗糖30g/L、酵母浸粉4g/L; 培养条件: 接种量7%、培养温度36℃、pH7、培养时间36h, 此条件下 β -胡萝卜素降解菌酶活力达到750.72U/L。

关键词: β -胡萝卜素降解菌; 响应面分析法; 优化

Optimization of Factors Affecting Microbial Production of β -Carotene Degrading Enzymes

WANG Shu-lin¹, ZHU Ming-ming², LI Jing³, ZUO Wei-ping¹

(1. College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, China;

2. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

3. College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Response surface methodology (RSM) was employed to optimize medium components and culture conditions for the production of enzymes capable of β -carotene degradation. A response surface equation was developed indicating the effects of the main variables identified by one-factor-at-a-time design on the β -carotene degradation activity of crude enzyme solution. Results showed that the highest β -carotene degradation activity of 750.72 U/L was achieved under the conditions: 36 h of culture at 36 °C with an inoculum concentration of 7% in a liquid nutrient medium containing sucrose 30 g/L and yeast extract powder 4 g/L at pH 7.

Key words: microbial β -carotene degradation; response surface methodology (RSM); optimization

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)13-0157-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201313034

β -胡萝卜素属于类胡萝卜素化合物^[1], 由于其特殊的理化作用, 广泛应用于食品, 医药保健, 饲料和化妆品行业^[2-3], 同时, 它又是一类重要的香料前体物^[4], 其通过酶或光氧化可以使双键断裂而产生C13、C11、C10、C9等衍生物, 包括 α -紫罗兰酮、 β -紫罗兰酮、二氢猕猴桃内酯和 β -大马酮等重要的香料物质^[5-8]。这些香味物质的阈值相对较低, 刺激性小, 香气品质好, 是果酒的重要香气物质, 对果酒香味品质影响显著^[9-12]。采用热解法和化学氧化降解等理化方法降解类胡萝卜素, 降解产物复杂, 产物品质差, 同时, 还存在耗能大, 生产成本低, 化学污染严重, 安全性差等问题。微生物降解可克服理化降解的缺陷, 而且能定向生产香料化合物^[13-15], 因此采用微生物降解类胡萝卜素生产香料化合物具有广阔前景, 对于改善果酒及发酵食品的香气品质也有积极作用。

国外对酶或微生物定向降解类胡萝卜素产香进行很多研究。Zorn等^[16]分离到了10株能降解类胡萝卜素的菌种, 其中, 5株微生物的发酵上清液可以使 β -胡萝卜素降解, 表明这些微生物能产生降解 β -胡萝卜素的特殊酶, 用芳香皱皮孔菌(*Ischnoderma benzoinum*)的发酵液转化叶黄素, 可形成7,8-二氢- β -紫罗兰醇, β -紫罗兰酮, 7,8-二氢- β -紫罗兰酮和3-氢- β -紫罗兰酮等。Sanchez-Contreras等^[17]从万寿菊上分离到2株微生物, 混合培养可以使类胡萝卜素和叶黄素转化为13个碳原子的降异戊间二烯衍生物。

本研究通过单因素和响应面试验^[18-20], 对从沙棘汁分离得到的1株可降解 β -胡萝卜素菌株的培养基配方及培养条件进行优化筛选, 确定出最佳培养条件, 旨在提高该微生物产生降解 β -胡萝卜素酶的能力, 为该微生物的系统研究和应用提供参考。

收稿日期: 2012-05-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060225)

作者简介: 王树林(1970—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术及食品加工技术。E-mail: wangsl1970@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

β -胡萝卜素(99.5%) 美国Fluka公司; 菌株ts-82(葡萄球菌属) 本实验室筛选保存。

UV-3802型比例双光束紫外-可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 培养基的制备

改良察氏培养基配方: 蔗糖30.0g、 NaNO_3 3.0g、 K_2HPO_4 1.0g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、 KCl 0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g、酵母浸粉3.0g, 蒸馏水1000mL, pH值自然。

1.2.2 类胡萝卜素溶液的配制

将5mg β -胡萝卜素和1.0g吐温-80溶于10mL的二氯甲烷中, 在避光的条件下, 将二氯甲烷挥发干净, 加入50mL无菌蒸馏水混匀, 得橘黄色、清澈的储备液, 放置在4℃冰箱中待用。

1.2.3 类胡萝卜素含量标准曲线的测定

取 β -胡萝卜素储备液20、40、60、80、100 μL , 加蒸馏水至3.25mL, 以蒸馏水做空白于460nm波长处测吸光度, 计算 β -胡萝卜素溶液浓度(c , $\mu\text{mol/L}$)与吸光度(A)的线性回归方程: $c=8391.1258A-230.5675$ ($R^2=0.9992$), 其 β -胡萝卜素溶液的吸光度介于0.2~0.8。

另取50、100、150、200、250 μL β -胡萝卜素标准水溶液, 按同样方法测吸光度得到 β -胡萝卜素水溶液吸光度大于0.8的浓度与吸光度的线性回归方程: $c=8677.4749A+561.2184$ ($R^2=0.9997$)。

1.2.4 酶活性测定

将培养36h的发酵液在4℃、10000r/min离心8min, 取上清液, 在光程1cm比色皿中加入2.9mL粗酶液, 再加入0.2mL类胡萝卜素储备液后, 立即在460nm波长处测吸光度, 然后将比色皿保温在37℃水浴中, 10min后再测吸光度, 得初始吸光度(A_0)和10min后的吸光度(A_t), 将 A_0 和 A_t 代入标准曲线中可得 β -胡萝卜素的初始浓度 c_0 和末浓度 c_t 。酶活力单位定义: 1min降解1 μmol 底物所需要的酶液为一个酶活力单位, 即1U, 利用下式计算粗酶液的酶活力(E)。

$$E(\text{U/L}) = \frac{(c_0 - c_t) \times (2.9 + 0.2)}{2.9 \times 10}$$

式中: c_0 为初始类胡萝卜素的浓度/ $\mu\text{mol/L}$; c_t 为10min后的类胡萝卜素的浓度/ $\mu\text{mol/L}$; 2.9为粗酶液的量, 本实验取2.9mL; 0.2为加入类胡萝卜素的量/mL; 10为时间, 本实验取10min。

1.3 单因素试验

培养时间、培养温度、接种量、初始pH值、碳源

和氮源营养因子是影响细菌生长的主要因素, 为了明确这些因素对细菌生长及酶活性的影响趋势, 首先进行单因素试验。以液体改良察氏培养基为基础培养基, 设计不同水平, 进行单因素试验。以提高 β -胡萝卜素降解菌酶活力为目标, 确定菌株生长的最佳条件。前期实验表明, 菌种的适宜生长温度为32~36℃左右。

1.4 响应面试验

根据Box-Behnken组合试验设计原理, 综合单因素试验结果, 选取培养温度、培养基中的蔗糖质量浓度、酵母浸粉质量浓度对 β -胡萝卜素降解菌酶活力影响显著的3个因素, 以酶活力为响应值, 进行三因素三水平响应面试验设计^[20]。

1.5 数据统计方法

使用Design-Expert7.0.0软件处理响应面试验数据。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 培养时间对 β -胡萝卜素降解菌酶活的影响

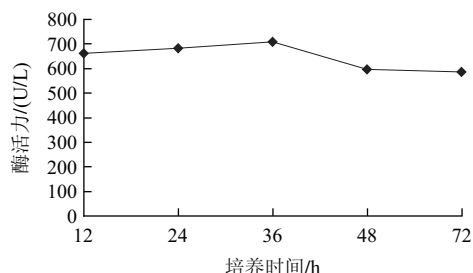


图1 培养时间对 β -胡萝卜素降解菌酶活的影响

Fig.1 Effect of incubation time on the activity of crude enzyme solution

由图1可知, 培养时间从12h增加到36h, 粗酶液酶活增加, 培养时间超过36h, 酶活开始下降。粗酶液酶活在培养36h达到峰值。24h和48h时, 粗酶液酶活分别是36h的96.3%和84.1%。因此在以下试验中, 将培养时间控制在36h。

2.1.2 培养温度对 β -胡萝卜素降解菌酶活的影响

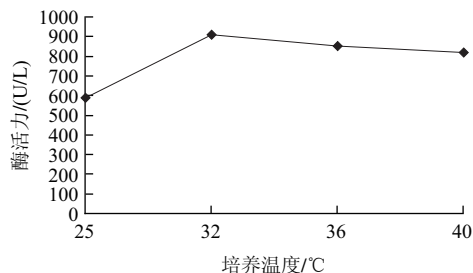


图2 培养温度对 β -胡萝卜素降解菌酶活的影响

Fig.2 Effect of incubation temperature on the activity of crude enzyme solution

由图2可知, 培养温度从25℃升高到32℃, 粗酶液的酶活明显增加, 培养温度超过32℃酶活开始下降。在25℃和40℃条件下培养36h, β -胡萝卜素降解菌酶活分别是32℃的64.5%和93.6%, 最佳的培养温度为32℃。

2.1.3 接种量对 β -胡萝卜素降解菌酶活的影响

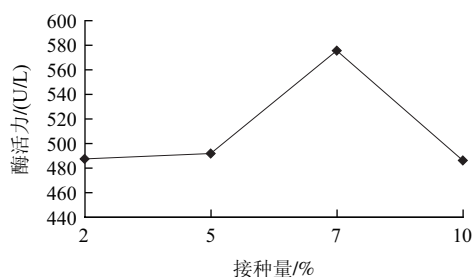


图3 接种量对 β -胡萝卜素降解菌酶活的影响

Fig.3 Effect of inoculum concentration on the activity of crude enzyme solution

由图3可知, 随着接种量的增大, β -胡萝卜素降解菌酶活也随之增多, 在接种量7%时达到最大值, 接种量为5%和10%的粗酶液酶活力分别为7%时的85.4%和84.4%, 所以, 接种量选定为7%。

2.1.4 初始pH值对 β -胡萝卜素降解菌酶活的影响

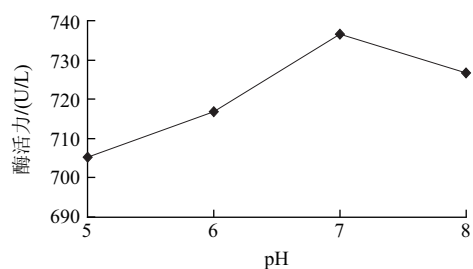


图4 初始pH值对 β -胡萝卜素降解菌酶活的影响

Fig.4 Effect of pH on the activity of crude enzyme solution

由图4可知, pH5~7时, 随着pH值增大, 粗酶液酶活上升, pH值超过7, 酶活力下降。pH 6和pH8的酶活力分别为pH7时的97.3%和98.7%。说明菌株能够适应弱酸和弱碱环境, 但在中性环境中生长较好。所以初始pH值控制在7。

2.1.5 蔗糖质量浓度对 β -胡萝卜素降解菌酶活的影响

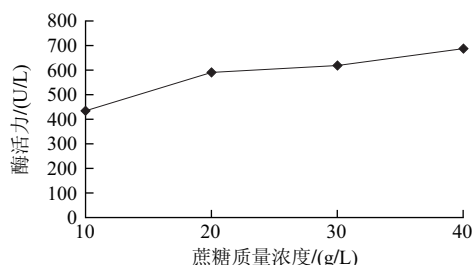


图5 蔗糖质量浓度对 β -胡萝卜素降解菌酶活的影响

Fig.5 Effect of sugar concentration on the activity of crude enzyme solution

由图5可知, 随着蔗糖质量浓度的增大, β -胡萝卜素降解菌酶活在不断地增加, 考虑到成本问题, 将蔗糖质量浓度定为40g/L。

2.1.6 酵母浸粉质量浓度对 β -胡萝卜素降解菌酶活的影响

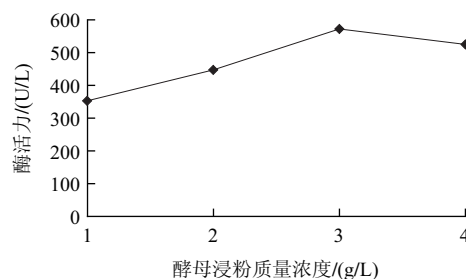


图6 酵母浸粉质量浓度对 β -胡萝卜素降解菌酶活的影响

Fig.6 Effect of yeast extract concentration on the activity of crude enzyme solution

由图6可知, 随着酵母浸粉质量浓度的增大, β -胡萝卜素降解菌的酶活增加, 在酵母浸粉质量浓度为3g/L时达到最大值, 所以将酵母浸粉质量浓度定为3g/L。

2.2 响应面法确定最佳培养条件的试验结果

2.2.1 响应面试验结果及回归模型的建立

表1 Box-Behnken响应面设计方案及结果
Table 1 Box-Behnken design matrix and results

试验号	因素			酶活力/(U/L)
	A培养温度/℃	B蔗糖质量浓度/(g/L)	C酵母浸粉质量浓度/(g/L)	
1	0(32)	0(40)	0(3)	447.49
2	0	0	0	566.13
3	-1(28)	1(50)	0	115.02
4	0	0	0	566.76
5	-1	0	-1(2)	281.98
6	-1	-1(30)	0	116.88
7	1(36)	0	-1	127.08
8	-1	0	1(4)	89.98
9	1	-1	0	628.06
10	0	1	-1	497.93
11	0	-1	-1	444.92
12	1	1	0	649.46
13	0	1	1	565.83
14	1	0	1	631.93
15	0	-1	1	583.92

响应面试验结果见表1。采用Design-Expert7.0软件对表1响应值与各个因素进行回归拟合后, 得到 β -胡萝卜素降解菌酶活力(Y)与培养温度(A)、蔗糖质量浓度(B)、酵母浸粉质量浓度(C)的二次多项回归方程(去掉不显著交互相)为:

$$Y = 526.79 + 179.08A + 6.81B + 64.97C + 174.21AC - 194.92A^2 + 45.48B^2 - 49.13C^2$$

对该模型及回归方程系数进行方差分析, 结果见表2。模型对试验具有较好的拟合程度($P < 0.05$), 模型失拟度不显

著($P=0.210>0.05$), 其校正决定系数 $R^2_{Adj}=0.7144$, 相关系数 $R^2=0.8980$, 表明该模型拟合程度较好。回归方程可以描述各因素与响应值之间的真实关系, 可利用该模型确定最佳培养条件。由表2可知, 因素A和交互项AC对粗酶液酶活性有明显差异($P<0.05$), 表明各因素对酶活的影响不是简单的线性关系。

表2 回归模型方差分析表

Table 2 Analysis of variance for the fitted regression model

方差来源	自由度	平方和	均方	F值	P值
模型	9	572900	63655.73	4.890	0.048
残差	5	65081.16	13016.23		
失拟项	3	55647.08	18549.03	3.930	0.210
纯误差	2	9434.09	4717.04		
A	1	256567.92	256567.92	19.710	0.010
B	1	370.74	370.74	0.028	0.870
C	1	33767.51	33767.51	2.590	0.170
AB	1	135.26	135.26	0.010	0.920
AC	1	121399.98	121399.98	9.330	0.030
BC	1	1263.80	1263.80	0.097	0.770
A ²	1	140289.02	140289.02	10.780	0.020
B ²	1	7638.82	7638.82	0.590	0.480
C ²	1	8911.58	8911.58	0.680	0.450

为进一步确定最佳试验因素值, 对编码值的回归方程取一阶导数, 求解得到编码值为: $A=0.9881$, $B=-1$, $C=1$, 换算成真实值分别为培养温度35.57℃、蔗糖质量浓度30g/L、酵母浸粉质量浓度4g/L。在此条件下进行培养, 由回归方程预测β-胡萝卜素降解菌粗酶酶活力为753.946U/L。

2.2.2 培养条件的响应面分析

通过模型数据所作的三维响应面图及与之对应的等高线图能比较直观的解释各个变量和变量交互作用对响应值的影响。等高线的形状可以反映出交互作用的强弱, 椭圆形表示两因素交互作用明显, 而圆形则与之相反。

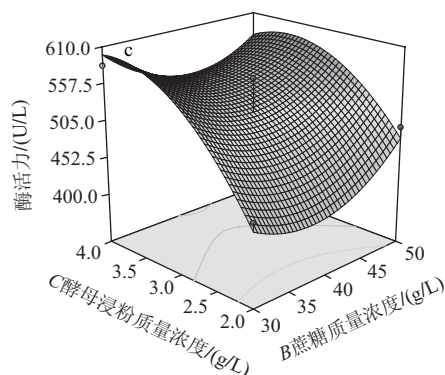
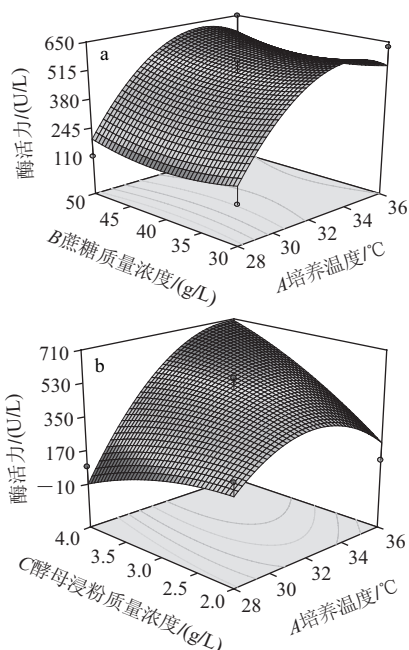


图7 各因素及其交互作用对酶活影响的等高线图和响应面图

Fig.7 Response surface plot and contour plot showing the interaction of sugar and yeast extract concentration on the activity of crude enzyme solution

由图7a可知, 培养温度和蔗糖质量浓度两者之间的交互作用不明显。温度对粗酶液酶活的影响较大, 温度低时酶活较低, 在本试验范围内随温度的升高, 酶活逐步增加, 在36℃有较高酶活, 将温度定为36℃、蔗糖质量浓度为30g/L。由图7b可知, 培养温度和酵母浸粉质量浓度二者的交互作用比较明显。随着培养温度和酵母浸粉质量浓度的升高, 粗酶液酶活升高。为实际操作便利, 确定最佳培养温度36℃, 酵母浸粉质量浓度为3~3.5g/L。由图7c可知, 蔗糖质量浓度和酵母浸粉质量浓度两者的交互作用不明显。酵母浸粉质量浓度对粗酶液酶活的影响较大。当蔗糖质量浓度为30~33g/L或者47~50g/L时, 粗酶液酶活随酵母浸粉质量浓度的增加先增后减, 有极大值点出现, 确定酵母浸粉质量浓度为3~4g/L。

2.2.3 验证实验

为检验响应面法所得结果的可靠性, 在上述响应面分析法求得的最佳条件下做3次重复实验, 测得β-胡萝卜素降解菌酶活力平均值为750.72U/L(预测值为753.946U/L), 因此, 基于响应面优化的发酵工艺参数准确可靠, 具有实用价值。

3 结论

近年来国内外关于微生物降解类胡萝卜素化合物的研究报道逐渐增多, 大多数研究表明培养条件及培养基组成对微生物酶活性都有明显影响, 这与本研究的结论基本一致。本实验对影响β-胡萝卜素降解菌酶活性的培养条件及培养基组成进行了优化, 结果表明, 最优工艺条件为: 接种量7%、培养温度36℃、pH7条件下培养36h, 培养基中蔗糖质量浓度30g/L、酵母浸粉质量浓度4g/L。近年来, 虽然有关于微生物降解类胡萝卜素化合物的研究报道, 但大多数研究报道仅限于真菌降解类胡

萝卜素的研究,关于细菌降解 β -胡萝卜素的研究报告并不多见,本实验只是从培养条件研究了影响该细菌酶活性的基本条件,关于该酶的性质、结构及降解机理的研究需要进一步的系统研究。

参考文献:

- [1] 刘维娟. β -胡萝卜素降解反应研究进展[J]. 林产化学与工业, 2008, 28(3): 122-126.
- [2] 胡兴娟, 张连富, 王晓岚, 等. β -胡萝卜素氧化降解产物及其抑制癌细胞活性的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(3): 61-65.
- [3] 李福枝, 刘飞, 曾晓希, 等. 天然类胡萝卜素的研究进展[J]. 食品工业科技, 2007, 27(9): 227-232.
- [4] MARIE-FRANCOISE N, NATHALIE V D G. Characterization of carotenoids and degradation products in oak wood. Incidence on the flavour of wood[J]. Comptes Rendus Chimie, 2004, 7: 689-698.
- [5] GUNATA Y Z, BAYONOVE C L, BAUMES R L, et al. The aroma of grapes. I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components[J]. Journal of Chromatography A, 1985, 331: 83-90.
- [6] KANASAWUD P, CROUZET J C. Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium. 1. β -Carotene degradation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1990, 38: 237-243.
- [7] MORDI C R, WALTON J C, BURTON G W, et al. Exploratory study of β -carotene auto oxidation[J]. Tetrahedron Lett, 1991, 32: 4203-4206.
- [8] SKOUROUMOUNIS G K, MASSY-WESTROPP R A, SEFTON M A, et al. Precursors of damascenone in fruit juices[J]. Tetrahedron Lett, 1992, 33: 3533-3536.
- [9] SILVA FERREIRA A C, MONTEIRO J, OLIVEIRA C, et al. Study of major aromatic compounds in port wines from carotenoid degradation[J]. Food Chemistry, 2008, 110: 83-87.
- [10] VILANOVA M, CORTES S, SANTIAGO J L, et al. Aromatic compounds in wines produced during fermentation: effect of three red cultivars[J]. International Journal of Food Properties, 2007, 10(4): 867-875.
- [11] 周冀衡, 杨虹琦, 林桂华, 等. 不同烤烟产区烟叶中主要挥发性香气物质的研究[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2002, 30(2): 20-23.
- [12] 王业勤, 李勤生. 天然类胡萝卜素: 研究进展、生产、应用[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1997.
- [13] 杨伟祖, 谢刚, 王宝兴, 等. 烟草中 β -胡萝卜素的热裂解产物的研究[J]. 色谱, 2006, 24(6): 611-614.
- [14] 刘维娟. β -胡萝卜素降解反应研究进展[J]. 林产化学与工业, 2008, 28(3): 122-126.
- [15] SANCHEZ-CONTRERAS A, JIMENEZ M, SANCHEZ S. Bioconversion of lutein to products with aroma[J]. Appl Microbial Biotechnol, 2000, 54: 528-534.
- [16] ZORN H, LANGHOFF S, SCHEIBNER M, et al. Cleavage of β , β -carotene to flavor compounds by fungi[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 62: 331-336.
- [17] RODRÍGUEZ-BUSTAMANTE E, SÁNCHEZ S. Microbial production of C_{13} -norisoprenoids and other aroma compounds via carotenoid cleavage[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2007, 33: 211-230.
- [18] 白杨, 钱斯日古楞, 王红英. 一株产胶原酶海洋微生物发酵条件的研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(4): 321-325.
- [19] 刘春梅, 张守义, 代亨燕, 等. 响应面分析法确定刺梨醋的加工工艺[J]. 中国调味品, 2011, 36(1): 40-44.
- [20] 赵选民. 实验设计方法[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 204-228.