

发酵法生产番茄红素培养方法的改进及优化

王 航 袁其朋* 张黛黛

(北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘 要: 研究了应用三孢布拉氏霉菌生产番茄红素的发酵工艺。针对菌种生长能力的降低,首次采用了孢子悬液直接接种的方式,并对菌种孢子的生长条件进行了优化。另外,提出了直接发酵培养的一级培养工艺,该工艺稳定、简便,不仅提高了番茄红素的产量,而且缩短了发酵培养时间。

关键词: 三孢布拉氏霉菌; 番茄红素; 发酵; 接种方式

中图分类号: TQ920.1

引 言

番茄红素(lycopene)是一种脂溶性不饱和碳氢化合物,是类胡萝卜素的一种,由于其兼具较高的营养价值和药用价值,目前广泛应用于食品、医药、化妆品和保健品行业^[1]。国内生产番茄红素的工艺主要有直接粉碎法、浸提、酶反应和超临界 CO₂ 流体萃取,另外,从品质、技术、生产资源成本等分析,利用微生物技术生产番茄红素均优于上述各方法^[2]。三孢布拉氏霉菌(*Blakeslea trispora*)是目前唯一能够实现胡萝卜素工业化生产的一种高产丝状真菌,目前,在俄罗斯、乌克兰等国已经实现了工业化生产^[3]。根据其代谢途径,若在其发酵过程中添加合适的阻断剂,阻断番茄红素到 β -胡萝卜素的环化反应,便可积累大量的番茄红素。但是,三孢布拉氏霉菌发酵生产番茄红素的传统工艺复杂,另外,随着菌体的老化,发酵培养时间增加,番茄红素的产量降低也是目前存在的主要问题^[4]。针对这些问题,本文在传统工艺的基础上,首次采用了孢子悬液直接接种的方式,该方式既节省了种子培养中所需的大量菌种,也提高了菌种在发酵培养基中的生长能力。另外,对孢子的生长条件进行了优化,提出了直接发酵培养的一级培养工艺,即将混合好的正负菌接种到发酵培养基中进行培养,该工艺稳定、简

便,不仅提高了番茄红素的产量,而且缩短了发酵培养时间。

1 材料与方法

1.1 菌株

三孢布拉氏霉菌(*Blakeslea trispora*)购自 ATCC,编号分别为 ATCC 14271(+), ATCC 14272(-),诱变得 203(+), 204(-)。

1.2 培养基

土豆(PDA)培养基 土豆提取液 1.0 L,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,VB₁ 0.02 g。

种子培养基(%) 淀粉 4,玉米浆 5,葡萄糖 2.5, KH₂PO₄ 0.1, MgSO₄ 0.01, VB₁ 0.001, pH 值 6.5。

发酵培养基(%) 淀粉 4,大豆饼粉 2,玉米浆 2.5, KH₂PO₄ 0.1, MgSO₄ 0.01, VB₁ 0.001, pH 值 6.5。

1.3 培养方法

种子培养 500 mL 三角瓶,装液量 100 mL, 28℃, 180 r/min, (+)(-)菌分别避光培养 40 h 后, (+)(-)菌培养所得培养液以体积比为 1:2 混合得种子液。

发酵培养 500 mL 三角瓶,装液量 90 mL,接入 10 mL 种子液,于 28℃, 250 r/min, 避光培养 120 h。

1.4 分析方法

1.4.1 孢子计数 微生物平板计数法^[5]。

1.4.2 细胞质量浓度测定 将发酵液抽滤得到的湿菌体,在 45℃ 真空干燥,恒定质量后称干质量,除以所取发酵液体积。

1.4.3 番茄红素产量测定 高效液相色谱法

收稿日期: 2005-12-20

基金项目: 国家自然科学基金(20376007)

第一作者: 女, 1981 年生, 硕士生

*通讯联系人

E-mail: yuanqp@mail.buct.edu.cn

(HPLC)。HPLC 分离柱为 Diamonsil C₁₈ (5 μm, 250 mm ×4.6 mm);流动相为乙腈与二氯甲烷体积比为 75:25;检测波长为 450 nm;柱温 28℃;流速 1.5 mL/min。样品处理:由于番茄红素为胞内产物,所以在用 HPLC 测定前,需将菌体碾磨提取番茄红素。实验中取 0.1 g 发酵所得干菌体研磨后,用石油醚萃取,过滤,定容于 25 mL 棕色容量瓶中,并添加 0.05 g 抗氧化剂 BHT。

2 结果与讨论

2.1 二级培养中最优接种方式的确定

以往发酵法生产番茄红素的过程中,其种子培养阶段采用的是将 PDA 培养基中的菌丝体连同培养基一起挑块儿直接加入种子培养基中进行液态培养。但是,由于菌种退化,其生长活力降低,现在采用相同的接种方式,在培养到所需时间后菌体容易集结成团(一般是负菌),而不是需要的米粒大小的菌球^[6],为后续的发酵培养带来很大的困难。根据三孢布拉氏霉菌的生长特性,我们设计采用了几种方法对接种方式进行改进,并通过多次重复实验找到了最优的接种方式,结果如表 1 所示。

表 1 不同接种方式的比较
Table 1 Comparison of inoculation methods

接种方式	具体操作	现象
菌丝体直接接种	将 PDA 培养基中的菌丝体连同培养基一起挑块儿直接加入种子培养基中进行培养	菌体几乎全部成团
添加玻璃珠	在种子培养基中加入玻璃珠,通过玻璃珠的相互碰撞将菌体块儿打碎,使其分散成长,避免成团	有的菌体成团,有的成米粒大小的球状,随机性很大
孢子直接接种	挑培养皿中菌丝体上的孢子囊直接加入种子培养基	少数菌体成团,多数成极小球状或丝状
孢子悬液接种	将孢子囊接入已灭菌的生理盐水中,磁粒搅拌,然后将孢子悬液接入种子培养基	菌体全部为极小球状或丝状

根据表 1 可以看出,采用孢子悬液的接种方式,菌体在种子培养基中均可生长为极小的菌球或丝状,没有成团现象发生。一般而言,丝状形态或极小的菌球形态均有利于其在液体发酵培养基中氧气运输和营养物质的吸收,因此,在以后的培养工艺中均可考虑采用孢子悬液的接种方式。

2.2 影响孢子的生长因素

2.2.1 最优培养时间的确定 在确定采用孢子悬液的接种方式之后,如何使菌体的孢子生长得更好就成为亟待解决的问题。在前期的实验中发现,菌体在 PDA 培养基中培养时间的不同会影响到孢子的生长状况。若时间过短,菌丝体尚未长出,不利于孢子的生长;若时间过长,导致菌丝体的老化,孢子生长量减少,因此,选择合适的培养时间至关重要。根据前人的实验结果,菌体在生长到第 4 天时进入生长稳定期,此时生长力最旺盛。所以,本文选择在 28℃ 条件下,分别培养到第 3、4、5 天将菌种从培养箱中取出,在 18℃ 继续生长 2 天,然后以微生物平板计数法测定每毫升菌液中的菌落数(CFU),结果如表 2 所示。

表 2 培养时间对孢子数的影响
Table 2 Effect of culture time on the number of spores

培养时间/d	CFU ×10 ⁻¹³ /mL	培养时间/d	CFU ×10 ⁻¹³ /mL
3	3.535	5	0.218
4	3.11		

根据表 2 可以看出,菌种在培养箱中培养 3 天,然后在 18℃ 继续培养 2 天,此时孢子的生长状况最好,数量最多。分析原因,菌种在适温下生长 3 天,正处于生长对数期,此时生长力很强,而且温度的变化对菌种生长状态的影响很大,所以,此时受到冷刺激,利于孢子的生长。而当菌种进入生长稳定期后,改变菌种的生长环境,对菌种的影响相对较小,产生的孢子量也相对较少。另外,冬天室内温度即在 18~20℃,且环境中氧气充足,因此,可以将菌体从培养箱中取出,室温下继续培养 2 天即可。

2.2.2 最适培养温度的确定 由于三孢布拉氏霉菌通常在冷/热刺激的情况下孢子的生长较好,而且该菌为嗜氧菌,光线对其也有一定的影响,因此,我们在有氧、见光的条件下,主要探讨温度对孢子生长情况的影响。实验设计,根据 2.2.1 节的实验结果,将已在培养箱中培养 3 天的菌种取出,在有氧、见光的条件下,分别在 18℃、23℃、28℃、33℃、38℃ 五个不同的温度下继续培养 2 天,然后测定每毫升菌液中的 CFU,实验结果如表 3。

根据表 3 的结果可以看出,在有氧、见光的条件下,菌体在培养箱中培养 3 天,然后在 18℃ 下继续培养 2 天,此时孢子的生长状况最好,数量最多。可见,低温刺激更有利于三孢布拉霉孢子的生长。

表 3 温度对孢子数的影响

Table 3 Effect of temperature on the number of spores

温度/	CFU $\times 10^{-13}$ /mL	温度/	CFU $\times 10^{-13}$ /mL
10	0.00159	28	0.162
18	3.11	33	0.11
23	0.759	38	0.00555

2.3 不同培养方法的比较

发酵法生产番茄红素通常采用的工艺都是在种子培养阶段正负菌分别培养,再以一定的比例同时接种于发酵培养基中进行混合发酵,这样,在大批量的摇瓶阶段,接种的操作时间很长,容易染菌;另外,在实际生产中,需要两个种子罐,而且因为正负菌的最适接种比例为体积比 1:2,这样需要采用不同大小的种子罐,或不同的装液量等措施,增加了操作的复杂度。因此,我们考虑能否在种子阶段就使正负菌混合,培养一定时间后,以此种子液接种发酵培养基,或者省去种子培养阶段,采用直接将混合好的正负菌接种到发酵培养基的一级培养方式。对此,我们鉴于前期研究的最适接种量和接种比例,比较了传统发酵培养法、种子培养阶段正、负菌混合培养法和直接发酵的一级培养法,分别记作 A、B、C 三种培养方法,实验结果见表 4。

表 4 不同培养方法生产番茄红素的比较

Table 4 Comparison of effect of different culture methods on lycopene synthesis

方法	具体操作	番茄红素产量/(mg/L)
A	正、负菌的孢子悬液分别以 1.5 mL 接种于种子培养基,培养 40 h,然后正负菌以体积比为 1:2 的比例混合,以体积分数 10% 的接种量接种发酵培养基,继续培养 120 h	195
B	正、负菌的孢子悬液以体积比 1:2 的比例,总量 1.5 mL 接种于种子培养基,培养 40 h,以体积分数 10% 的接种量接种发酵培养基,继续培养 120 h	38
C	正、负菌的孢子悬液以体积比 1:2 的比例,总量 1.5 mL 直接接种于发酵培养基,培养 120 h	262

根据表 4 中的结果显示,采用 C 方法,即将混合好的正、负菌的孢子悬液直接接种到发酵培养基的一级培养方法得到的番茄红素的产量最高,与传统方法相比高出了 34%,而且该方法省去了种子培

养阶段,节约成本,减少了操作的复杂度,同时对孢子的需求量不大,从生产的角度考虑,该方法要简便、经济得多,故我们决定在以后的实验过程中采用直接发酵培养的一级培养工艺。

2.4 一级培养条件的优化

2.4.1 阻断剂的最优添加时间 在确定采用一级培养工艺以后,须对该工艺的各种条件进行优化。参考前期的实验,阻断剂的添加时间对番茄红素产量的影响很大,因此,确定阻断剂的最优添加时间非常必要。实验设计从接种完成开始计时,12 h 后向两瓶培养基中添加阻断剂,再隔 12 h 向另外两瓶培养基中添加阻断剂,以此类推,发酵培养 132 h,干燥菌体,使用高效液相色谱 (HPLC) 测定番茄红素的产量以确定阻断剂的最优添加时间,实验结果如图 1 所示。

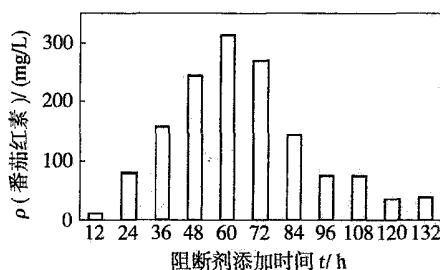


图 1 阻断剂的添加时间对番茄红素产量的影响

Fig. 1 Effect of the time of blocking agent addition on lycopene synthesis

从图 1 可以看出,在发酵 60 h 时添加阻断剂,此时番茄红素的产量最高,可以达到 314 mg/L,分析原因,若阻断剂添加时间过早,会抑制三孢布拉氏霉菌的生长,以致番茄红素的产量降低;若添加时间过晚,发酵已进入后期,阻断不充分,菌体中 β -胡萝卜素含量较多,而番茄红素的产量就会相应减少,故选择 60 h 为阻断剂的最优添加时间。

2.4.2 生长曲线的测定 发酵终点的判断需综合多方面的因素统筹考虑。不过,一般都是以提高生产率为首要的目标。为此,我们测定了一级培养的生长曲线,主要从两方面来确立发酵时间:一方面是菌体的生长指标,即细胞质量浓度;另一方面则是菌体的代谢指标,即番茄红素的产量。实验设计从接种完成开始计时,发酵培养 9 天,每隔 12 h 取样测定菌体的细胞质量浓度以及番茄红素的产量,结果见图 2 和图 3。

从图 2 可以看出,随着时间的推移,三孢布拉氏

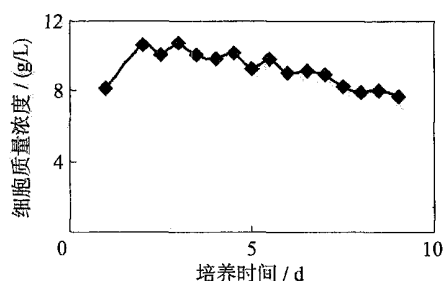


图 2 细胞质量浓度随时间的变化

Fig. 2 Time course of cell growth

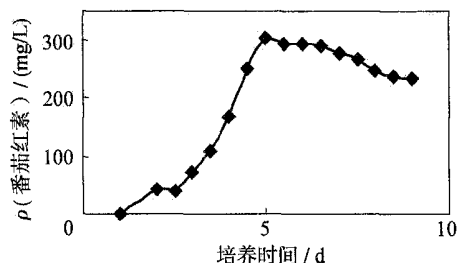


图 3 番茄红素的产量随时间的变化

Fig. 3 Time course of lycopene synthesis

霉菌的生长快速进入生长稳定期,从第 2 天到第 5 天,菌体生长达到最大,干重基本不变,而当生长到第 6 天后,菌体生长进入衰退期,干重开始逐渐降低。图 3 说明,在发酵前 2.5 天,即未加入阻断剂之前,细胞中番茄红素的含量很低,当加入阻断剂后,阻断了番茄红素到 β -胡萝卜素的两步环化反应,将代谢控制在番茄红素阶段,因此,细胞中的番茄红素

的含量迅速增加;当发酵培养到第 5 天,细胞中番茄红素的含量达到最大值,在第 7 天后开始逐渐减少。综合上述因素,我们确定一级培养工艺的发酵培养时间为 5 天。

3 结论

(1) 菌体在 28℃ 下生长 3 天,然后在 18℃ 继续生长 2 天,此时菌体的孢子生长状况最好,数量最多;并且充足的氧气和良好的光照条件对生长有利。

(2) 采用直接发酵培养的一级培养工艺,番茄红素的产量比传统工艺提高了 34%;在第 60 h 添加阻断剂,发酵时间为 120 h 的情况下番茄红素的含量最高。

参 考 文 献

- [1] 尚德军,王军. 番茄红素研究现状与展望[J]. 检验检疫科学, 2004, 14(2): 59 - 61.
- [2] 冀智勇,吴勇书,刘智梅. 番茄红素的保健作用及生产工艺的研究进展[J]. 中国调味品, 2005(10): 4 - 8.
- [3] 王见冬. 生物法合成番茄红素的工艺研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2003.
- [4] 姜文侯,单志萍. β -胡萝卜素的应用、市场和天然产品的发酵生产[J]. 食品与发酵工业, 1994, 3: 65 - 71.
- [5] 沈萍,范秀容,李广武. 微生物学实验[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [6] 曾强松,童海宝,徐静安. 三孢布拉霉发酵生产 β -胡萝卜素工艺研究[J]. 工业微生物, 2002, 32(4): 7 - 10.

Improved culture methods and optimized conditions for lycopene production by *Blakeslea trispora*

WANG Hang YUAN Qi-peng ZHANG Dai-dai

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: A study of the fermentative production of lycopene by *Blakeslea trispora* is reported. In order to combat the decline in the viability of *B. trispora*, a convenient inoculation method was established, and the growth conditions of *B. trispora* spores were subsequently optimized. In addition, by adopting a direct and stable convenient fermentation progress, it was shown that the yield of lycopene could be increased and the period of fermentation shortened.

Key words: *Blakeslea trispora*; lycopene; fermentation; inoculation method