

烟草和 MPTA 对三孢布拉氏霉合成番茄红素的影响

修 宇 袁其朋*

(北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘 要: 在三孢布拉氏霉发酵 48 h 添加 3.6 mmol/L 2-(4-甲基苯氧)-三乙基胺(MPTA)可有效抑制 96% β -胡萝卜素的合成;添加 15 g/L 烟草可促进总类胡萝卜素的产量(170 mg/L),但其对 β -胡萝卜素的合成抑制作用低于 MPTA。L₂₇(3¹³)正交实验从抑制剂添加时间、添加量以及两种抑制剂的交互作用等方面考察了同时添加 MPTA 和烟草对番茄红素产量的影响。发酵 48 h 同时添加烟草 10 g/L 与 MPTA 2.2 mmol/L,番茄红素的产量可达 205 mg/L (占总类胡萝卜素产量的 94%)。

关键词: 番茄红素;生物合成;环化酶;抑制剂

中图分类号: TQ920.1

引 言

番茄红素是类胡萝卜素代谢合成过程中的重要中间体,具有很强的清除氧自由基能力^[1],并在调控、抑制癌细胞增殖方面^[2]有很好的疗效,近年来已广泛应用到保健品、医药等领域。番茄红素的生方法主要有化学合成法、天然产物提取法和生物合成法。相较而言,微生物发酵生产番茄红素成本低、污染小、产量高,具备工业化潜力^[3-4]。

目前在全球范围内,三孢布拉氏霉菌(*Blakeslea trispora*)是唯一能够实现 β -胡萝卜素工业化生产的高产菌株。在此基础上通过抑制代谢过程中番茄红素到 β -胡萝卜素的环化反应,即可实现番茄红素的生物合成,如 López-Nieto^[4]等人以咪唑、吡啶做抑制剂应用 *B. trispora* 生产番茄红素取得了很好的效果。常用的番茄红素环化反应抑制剂还有三乙胺衍生物、烟碱及烟碱和吡啶的衍生物等^[5-8]。Bouvier 等人^[5]研究指出,三乙胺衍生物会影响芳香基团的质子化和氨基酸残基的羧基化,进而抑制类胡萝卜素的碳阳离子化及环化。对果蔬的实验发现,三乙胺衍生物不仅用量小,如 2-(4-硫代氯苯)-三乙胺(2-(4-chlorophenylthio)-triethylamine, CP-

TA)5 mmol/L^[5]、2-(4-甲基苯氧)-三乙基胺(2-(4-methylphenoxy) triethylamine, MPTA)10~20 μ mol/L^[9],而且可明显提高番茄红素的产量,产物中几乎没有环化产物(辣椒黄素、辣椒红素、 β -胡萝卜素、叶黄素),这与其他吡啶、烟碱化合物^[5-8]在积累番茄红素的同时还伴随大量 β -胡萝卜素等环化物产生的现象形成鲜明对比。

目前还未见将三乙胺衍生物应用于微生物类胡萝卜素代谢合成的相关报道。本文报道了 MPTA 在三孢布拉氏霉菌生产番茄红素发酵过程中的应用,将其作用效果与卷烟厂的废弃烟丝作用效果相比较,验证了 MPTA 对降低 β -胡萝卜素产量、积累番茄红素的高效性,为得到廉价、高效的番茄红素环化酶抑制剂提供了依据。

1 实验部分

1.1 菌种及主要试剂

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(-)。

苏丹、石油醚,分析纯,北京北化精细化学品有限公司;乙腈、二氯甲烷,色谱纯,Dima 公司;烟草,北京中南海卷烟厂;MPTA,对甲苯酚在强碱条件下与二乙氨基氯乙烷盐酸盐反应合成。

1.2 培养基

种子培养基(g/L):淀粉 40,玉米浆 50,葡萄糖 25,KH₂PO₄ 1,MgSO₄ 0.1,VB₁ 0.01,pH 6.5。

发酵培养基(g/L):淀粉 40,大豆饼粉 20,玉米

收稿日期:2008-05-20

基金项目:国家自然科学基金(20376007)

第一作者:女,1982年生,硕士生

* 通讯联系人

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

浆 25, KH_2PO_4 1, MgSO_4 0.1, VB_1 0.01, pH 6.5。

1.3 培养方法

经 40 h 一级种子培养(28℃, 180 r/min, 装液量 100 mL/500 mL 锥形瓶)后, (+)(-)菌按照 1:2 比例混合后转接入发酵培养基中避光培养 120 h (28℃, 250 r/min, 装液量 90 mL/500 mL 锥形瓶)^[10]。烟草采取高温灭菌(121℃, 30 min), MP-TA 采用 0.45 μm 微孔滤膜过滤的方式除菌, 于发酵 48 h 添加到发酵液中。

1.4 正交实验

为考查烟草和 MP-TA 同时作用时对三孢布拉氏霉菌合成番茄红素的影响, 以及两种抑制剂间的交互作用, 设计 4 因素 3 水平带交互影响的正交试验 $\text{L}_{27}(3^3)$ 方案如表 1 所示。

表 1 烟草与 MP-TA 混合作用正交实验方案 $\text{L}_{27}(3^3)$

Table 1 The orthogonal representation of inhibitors mixture

水平	因素			
	A	B	C	D
1	2.2	5	36	36
2	3.6	10	48	48
3	4.5	15	60	60

A 为 MP-TA 添加量, $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; B 为烟草添加量, $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; C 为 MP-TA 添加时间, h; D 为烟草添加时间, h

1.5 分析方法

高效液相色谱法测定干菌体中番茄红素、 β -胡萝卜素的质量浓度^[11]。Hitach 高效液相色谱: Diamonsil C_{18} (5 μm , 250 mm \times 4.6 mm), 乙腈和二氯甲烷的体积比是 75:25, 450 nm, 28℃, 1.5 mL/min。

2 结果与讨论

2.1 烟草及 MP-TA 对类胡萝卜素合成代谢的影响

根据文献报道, 尼古丁可以帮助积累番茄红素^[5-8]; 经过 MP-TA 处理的柠檬、柑橘果皮以及生菜中 β -胡萝卜素含量明显降低^[12]。本实验选择含有天然尼古丁的烟草和 MP-TA 作为添加剂, 以不添加任何抑制剂的样品为空白参比, 研究其对三孢布拉氏霉菌代谢过程中番茄红素环化反应的影响。于发酵 48 h, 分别添加烟草 (15 g/L 发酵液) 和 MP-TA (3.6 mmol/L 发酵液), 测定菌体中番茄红素、 β -胡萝卜素含量, 结果如图 1~2 所示。

实验表明, 烟草和 MP-TA 都可以抑制三孢布拉氏霉菌代谢过程中番茄红素的环化反应, 进而积累

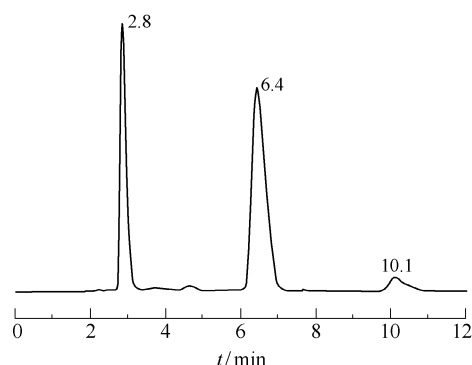


图 1 发酵产物的高效液相色谱结果

Fig. 1 HPLC result of fermentation products

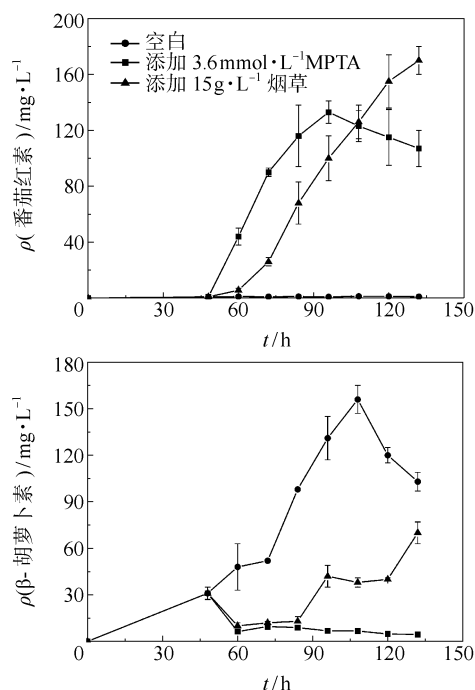


图 2 MP-TA 和烟草对三孢布拉氏霉菌代谢合成番茄红素、 β -胡萝卜素的影响

Fig. 2 Time-course of the lycopene and β -carotene synthesis by *B. trispora* with MP-TA or tobacco

中间代谢产物番茄红素, 而 β -胡萝卜素产量大幅度减小(图 2)。在 MP-TA 的作用下, 三孢布拉霉几乎不产 β -胡萝卜素(产量仅为参比的 4.4%), 相应的番茄红素的产量为 132 mg/L。以烟草作为抑制剂的样品番茄红素产量更可达 170 mg/L, 但伴随有一定量的 β -胡萝卜素生成(70 mg/L), 而且继续增加烟草添加量并不会减少 β -胡萝卜素产生, 反而会降低各种类胡萝卜素的产量, 直至菌体死亡。但是, 烟草作用后的样品中, 总类胡萝卜素的产量会增加, 并且高于 MP-TA 添加样品。这是由于三孢酸是类胡萝卜素代谢过程中的性激素^[10], 而 β -胡萝卜素又是三

孢酸的前体物,所以一定含量的 β -胡萝卜素会对类胡萝卜素的合成起到促进作用。天然烟草中还含有萜烯类、糖类物质和微量元素等多种营养物,可以作为前体物或者营养物促进微生物代谢。

图 2 还表明,向发酵液添加 3.6 mmol/L MPTA 12 h 后,发酵液中番茄红素即得到明显的累积,24 h 后番茄红素的含量已比参比提高了 99 倍。相比而言,烟草的添加会延长菌体的代谢迟滞期,而且产物中 β -胡萝卜素的含量偏高。

2.2 烟草和 MPTA 共同作用对类胡萝卜素代谢的影响

发酵过程中同时添加烟草和 MPTA 的 $L_{27}(3^{13})$ 正交实验结果方差分析如表 2。

表 2 正交实验结果方差分析

Table 2 The variance analysis of orthogonal results

来源	离差 Q	自由度	均方离差	F 值	显著性
A	30193	2	15096	56.5	* *
A×B	13188	4	3297	12.3	* *
A×C	5708	4	1427	5.34	*
B×C	3255	4	814	3.04	
误差	3208	12	267.3		
总和	55552	26			

A×B 表示 MPTA 添加量和烟草添加量的交互影响;A×C 表示 MPTA 添加量及其添加时间的交互影响;B×C 表示烟草添加量和 MPTA 添加时间的交互影响

从表 2 方差分析知,各因素影响番茄红素产量的主次关系为: $A > (A \times B) > (A \times C) > (B \times C)$,其中 MPTA 的添加量、MPTA 添加量和烟草添加量的交互作用对番茄红素产量的影响为高度显著,MPTA 添加量及其添加时间的交互作用对番茄红素的产量有显著影响。

正交实验 $L_{27}(3^{13})$ 每 2 个因素间有 9 种搭配组合,每种搭配有 3 次试验,将 3 次番茄红素产量加和之后做比较可知, A_1B_2 组合番茄红素产量最高 (549.9 mg/L), A_1B_1 (439.8 mg/L) 次之; A_1C_2 组合 (509.73 mg/L) 优于 A_1C_3 (379.98 mg/L); B_1C_3 组合 (379.98 mg/L) 优于 B_2C_1 (367.71 mg/L)。综合考虑表 2 中显示的各影响因素主次关系,番茄红素产量最优的搭配为 $A_1B_2C_3D_2$,另外考虑操作简便性,补充实验中还考察了 $A_1B_2C_3D_3$ 和 $A_1B_2C_2D_2$ 组合,实验结果见表 3。

因此烟草和 MPTA 混合抑制剂的最优搭配为

表 3 不同抑制剂对番茄红素和 β -胡萝卜素产量的影响

Table 3 Effect of addition of inhibitors on lycopene and β -carotene production

抑制剂	$\rho/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$		系数 *	
	番茄红素	β -胡萝卜素	番茄红素	β -胡萝卜素
空白	0.6 ± 0.1	156 ± 6	1	1
烟草	170 ± 10	70 ± 10	2.83	0.45
MPTA	132 ± 8	6.8 ± 0.6	2.20	0.044
$A_1B_2C_3D_2$	128 ± 12	9 ± 3	2.13	0.058
$A_1B_2C_2D_2$	205 ± 14	13 ± 2	3.42	0.083
$A_1B_2C_3D_3$	173 ± 8	19 ± 2	2.88	0.12
咪唑 ^[4]	—	—	1.13	0.11
吡啶 ^[8]	—	—	1.51	1.02

* 不同抑制剂添加样类胡萝卜素产量与空白样产量比

烟草 10 g/L (根据烟草品种不同,尤其是尼古丁含量的差异,其添加量会略有差别)、MPTA 2.2 mmol/L 发酵液,共同于发酵 48 h 后添加,番茄红素的产量最高,占同类胡萝卜素产量的 94%。与已有对咪唑^[4]、吡啶^[8]的报道相比较(表 3),MPTA 对 β -胡萝卜素的合成有很强的抑制作用,尤其当 MPTA、烟草同时使用时,不仅减少了抑制剂的用量,而且番茄红素的产量和纯度都得到了提高。这一研究成果为三孢布拉氏霉番茄红素环化反应的抑制、积累高纯度的番茄红素产物提供了更广泛的选择。

3 结论

MPTA 和烟草均可抑制三孢布拉氏霉 β -胡萝卜素的合成代谢。发酵 48 h,同时添加 2.2 mmol/L MPTA 和 10 g/L 烟草可抑制 92% β -胡萝卜素的合成,发酵液中番茄红素产量为 205 mg/L。

参考文献:

- [1] Lindshield B L, Canene-Adams K, Erdman J W Jr. Lycopeneoids: Are lycopene metabolites bioactive? [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2007, 458(2): 136–140.
- [2] Gupta S. Prostate cancer chemoprevention: Current status and future prospects [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2007, 224(3): 369–376.
- [3] 徐娜, 郑珩, 许激扬. 微生物生产番茄红素及其发酵促进剂的研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2006, 27(2): 114–116.
- [4] López-Nieto M J, Costa J, Peiro E, et al. Biotechnological lycopene production by mated fermentation of

- Blakeslea trispora[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2004, 66(2): 153–159.
- [5] Bouvier F, d'Harlingue A, Camara B. Molecular analysis of carotenoid cyclase inhibition[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1997, 346(1): 53–64.
- [6] 徐娜, 郑珩, 许激扬. 环化酶抑制剂对三孢布拉霉产生番茄红素的影响[J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(6): 372–375.
- [7] Choudhari S M, Ananthanarayan L, Singhal R S. Use of metabolic stimulators and inhibitors for enhanced production of β -carotene and lycopene by *Blakeslea trispora* NR-RL 2895 and 2896[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(8): 3166–3173.
- [8] Mantzouridou F, Tsimidou M Z. Lycopene formation in *Blakeslea trispora*. Chemical aspects of a bioprocess[J]. Trends in Food Science & Technology, 2008, 19(7): 363–371.
- [9] Phillip D M, Young A J. Preferential inhibition of the lycopene ϵ -cyclase by the substituted triethylamine compound MPTA in higher plants[J]. Journal of Plant Physiology, 2006, 163(4): 383–391.
- [10] 徐军伟, 徐芳, 袁其朋. 三孢酸结构类似物对发酵生产番茄红素的影响[J]. 北京化工大学学报: 自然科学版, 2007, 24(2): 134–137.
- [11] Xu F, Yuan Q P, Dong H R. Determination of lycopene and β -carotene by high performance liquid chromatography using sudan I as internal standard[J]. Journal of Chromatograph B, 2006, 838(1): 44–49.
- [12] 陶俊, 张上隆, 张良诚, 等. MPTA 对柑桔果皮类胡萝卜素形成的影响[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2002, 28(1): 46–50.

The application of tobacco and MPTA during lycopene production by *Blakeslea trispora*

XIU Yu YUAN QiPeng

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

Abstract: The efficacy and optimization of the application of two inhibitors, tobacco and bleaching herbicide 2-(4-methylphenoxy)-triethylamine (MPTA), on lycopene productivity by *Blakeslea trispora* were investigated. The greatest yield of lycopene (170 mg/L) was observed when nicotine in the form of tobacco was added at 15 g/L at 48 hours old mated cultures, however, this addition did not inhibit β -carotene synthesis to the same extent as MPTA's, but resulted in 53% increase in overall carotenoid synthesis. Lycopene biosynthesis was strongly stimulated (205 mg/L) at the expense of β -carotene when 2.2 mmol/L MPTA and 10 g/L tobacco added together at 48 hours following inoculation. Because of the low quantity but great efficiency, this compound inhibitor of tobacco and MPTA will become a potential choice of inhibiting lycopene cyclase in *Blakeslea trispora*.

Key words: lycopene; biosynthesis; lycopene cyclase; inhibitor