

光合细菌 R_1 发酵产类胡萝卜素的研究

顾 青 梁新乐 励建荣

(杭州商学院食品生物与环境工程学院, 杭州, 310035)

摘 要 对光合细菌 R_1 产类胡萝卜素进行发酵条件优化, 初步确定了获得类胡萝卜素较高产率的合适培养条件, 以 0.3% 的 NaAc 为碳源, 0.3% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源, 加入 0.15 g/L 的 MgSO_4 , 接种量为 8%, 在 pH 值 7.0 左右, 1500 lx 的光照度下, 30℃, 经 5 d 的发酵后, 类胡萝卜素在 476 nm 下的 OD 值可达 1.280。

关键词 光合细菌 类胡萝卜素 发酵优化

类胡萝卜素(carotenoids)是具有多个共轭双键的萜烯基团类化合物, 是应用极为广泛的色素之一, 它具有着色和营养增补的功能^[1,2]。近来, 它的医疗保健作用越来越引起人们的广泛关注, 研究发现, 类胡萝卜素可以防护紫外线、防止化学致癌物诱发癌变^[3,4], 能清除体内超氧自由基, 具有抗衰老的功效^[5,6], 在医药、食品、化妆品、饲料等行业将有广泛的应用。

利用微生物生产类胡萝卜素是获得生物资源型类胡萝卜素的重要途径。光合细菌中含有丰富的类胡萝卜素, 近年来, 从中提取的类胡萝卜素在食品、饲料及化妆品等领域已有应用。为进一步探讨影响其合成的各种因素, 提高产量, 本实验室利用一株类胡萝卜素含量较高的光合细菌进行研究, 确定了该菌株的优化培养条件, 获得了较好的结果, 为工业化发酵生产类胡萝卜素提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 种

红假单胞菌(*Rhodospseudomonas* sp. R_1), 本院菌种保藏室提供。

1.1.2 培养基

斜面培养基: 10 Be*麦芽汁, 2.5% 琼脂。

发酵培养基: 质量浓度为 0.05% KH_2PO_4 、0.06% K_2HPO_4 、0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.02% NaCl、0.02% MgSO_4 、0.05% CaCl_2 、0.1% NaAc、0.01% 酵母膏, pH 7.0。培养条件: 将菌种斜面活化, 接种 2 环斜面培养物于液态培养液中, 250 mL 三角瓶装 80 mL 培养液, 30℃ 培养 2 d, 然后以一定接种量接种于发酵培养液中, 250 mL 三角瓶装 100 mL 培养液, 在 30℃, 1500 lx 光照下, 厌氧静置培养 7 d, 测生物量和类胡萝卜素。

1.1.3 主要仪器及设备

UV-1601 型紫外分光光度计(日本岛津)、IFQ85A 旋转蒸发器(上海医械专机厂)、721 分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

1.2 分析方 法

1.2.1 菌体浊度测定

用 721 分光光度计在 660 nm 波长处测发酵液 OD 值。

1.2.2 pH 测定

pHS-25 型 pH 电极。

1.3 色素的提取和含量测定

按参考文献[7]的方法略作改进, 将培养液转入离心管中, 4000 r/min 离心 20 min, 弃上清液, 用无菌水洗涤沉淀 2 次, 再用 4000 r/min 离心 20 min, 加入丙酮液, 超声破碎 4~6 min 得丙酮提取液, 在 $\text{OD}_{476\text{ nm}}$ 下测其中

第一作者: 博士研究生, 讲师。

收稿时间: 2001-03-11

类胡萝卜素的相对浓度。丙酮提取液经旋转蒸发干燥器蒸发干溶剂,收集粗色素,加入等体积石油醚,充分振荡静置分层,取上层石油醚层加入等体积 10% KOH 的甲醇液,充分振荡,加入少量 5% NaCl 溶液促进分层。上层醚层为黄红色,下层水相为深绿色,弃下层,上层用 5% NaCl 溶液反复洗涤,洗净甲醇,将获得的红色石油醚提取液,40℃ 旋转蒸发器中干燥,得纯色素。

1.4 色素的鉴定

1.4.1 显色反应

浓 H_2SO_4 显色反应:将含有纯色素的石油醚加入装有浓 H_2SO_4 的试管中,观察其颜色变化。

浓 HCl 显色反应:将含有纯色素的石油醚加入装有浓 HCl 的试管中,振荡片刻,观察其颜色变化。

Carr-price 反应:将纯色素的 CCl_4 溶液加入有 $SbCl_3$ 的 CCl_4 溶液的试管中,振荡后,观察其颜色变化。

1.4.2 色素紫外分光光度扫描

将 Merck 公司的 β -胡萝卜素标准品和提纯色素的石油醚溶液,用 UV-1601 型紫外分光光度计进行 200~900 nm 波长范围光吸收扫描,测最大吸收峰。

1.4.3 薄层层析

用薄层层析硅胶(60 型)制成一定厚度的薄板,分别用纯化的色素和 β -胡萝卜素标准品点样,在展开剂[V(正己烷):V(乙醚)=1:1]中单向展层,使各组分分离。

2 结果与讨论

2.1 色素的鉴定

将从光合细菌中提取到的含有纯色素的乙醚溶液倾入装有 1~2 mL 浓 H_2SO_4 的试管中,发现在 2 相交处呈青兰色。

将从光合细菌中提取到的含有纯色素的乙醚溶液倾入装有 1~2 mL 浓 HCl 的试管中,振荡片刻,下层呈浅兰色。

将含有纯色素的 CCl_4 溶液加入 1 mL

$SbCl_3$ 的 CCl_4 溶液的试管中,振荡后溶液呈兰色。

以上试验说明有类胡萝卜素存在。

提纯色素的石油醚溶液经 UV-1601 型紫外分光光度计扫描后,其吸收光谱在 $\lambda_{476\text{nm}}$ 处有一峰值,这与 β -胡萝卜素标准品的吸收光谱接近。提取色素与标准 β -胡萝卜素的吸收光谱并非完全一致,主要是由于提纯色素类胡萝卜素,是非单一色素,还含有少量其他类胡萝卜素。提纯色素经展层剂[V(正己烷):V(乙醚)=1:1]展层,可以明显地看到 4 个点,从上而下依次为黄色、浅黄色、粉红色、浅黄色。与标准 β -胡萝卜素对照发现,第 1 个黄点与标准样同步平移, R_f 值大体相同,说明该色素中含有一定量的 β -胡萝卜素。

2.2 不同碳源浓度对类胡萝卜素生成的影响

碳源浓度的变化是影响色素生长的重要条件。在基础培养基的基础上,按质量分数配制含 NaAc 为 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3% 和 0.4% 的培养基,进行发酵。实验结果见图 1。

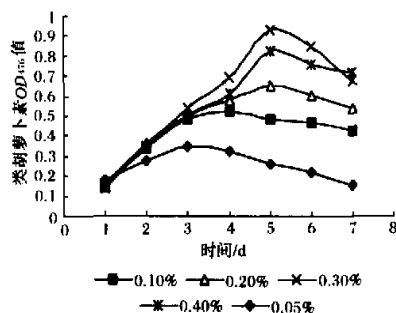


图 1 不同 NaAc 质量分数对类胡萝卜素生成的影响

结果表明,当 NaAc 质量分数为 0.3% 时,其色素产量较高。

2.3 氮源浓度对类胡萝卜素生成的影响

在基础培养基的基础上,按质量分数配制含 $(NH_4)_2SO_4$ 为 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3% 和 0.4% 的培养基,进行发酵。实验结

果见图2。

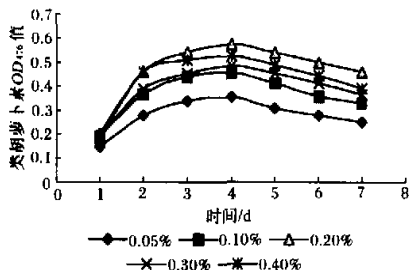


图2 不同 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数对类胡萝卜素生成的影响

结果表明,当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数为0.2%时,其色素产量较高。

2.4 Mg^{2+} 对光合细菌产类胡萝卜素的影响

将培养基中的 MgSO_4 ,分别配制成0.05,0.10,0.15,2.0,2.5和3.0 g/L进行培养。结果见图3。

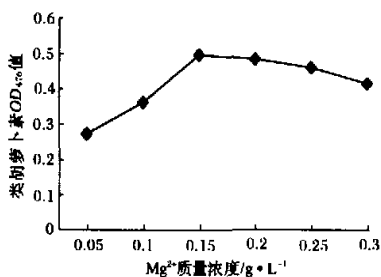


图3 Mg^{2+} 对光合细菌产类胡萝卜素的影响

由图3可以看出, Mg^{2+} 对光合细菌产类胡萝卜素较大的影响,在0.15 g/L附近,测得的类胡萝卜素OD值较高,而低于0.1 g/L时,色素合成受抑制较明显,所以认为0.15 g/L MgSO_4 是一个较适的质量浓度。

2.5 培养温度对类胡萝卜素生成的影响

调节微生物生长繁殖和代谢最适温度,对稳定发酵过程,缩短发酵周期和提高发酵产量具有现实意义。分别考察25,28,30,35和40℃5个温度下类胡萝卜素生成情况,结果见图4。结果表明,在28~30℃,色素产量较高,30℃最佳。

2.6 光照度对类胡萝卜素生成的影响

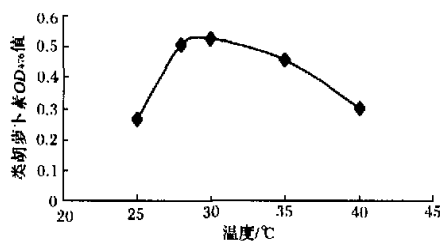


图4 温度对类胡萝卜素生成的影响

分别选取500,1000,1500,2000和2500 lx 5个不同的光照度对光合细菌进行培养,结果见图5。

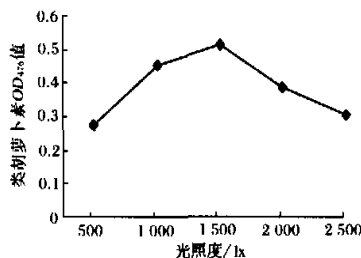


图5 光照度对类胡萝卜素生成的影响

在1500 lx光照度下,类胡萝卜素OD值较大,光照度过低,不利微生物的生长;光照度过高,会使生成的类胡萝卜素分解。

2.7 接种量对类胡萝卜素生成的影响

分别将4,6,8,10和12%的种子液接至发酵培养基中,在30℃,培养5 d,测定其OD值,结果见图6。

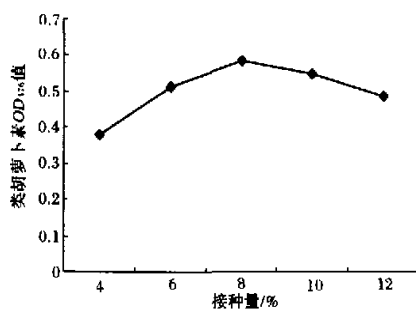


图6 接种量对类胡萝卜素生成的影响

结果可见,接种量以8%左右较为合适,

接种量过高过低对菌体细胞的色素合成均有影响,接种量少,发酵时间长;接种量大,营养消耗也大,不利色素的积累,生成色素反而下降。

2.8 发酵时间的确定

在不同的培养时间取样,分别测其菌体生物量和类胡萝卜素 OD 值,结果见图 7。

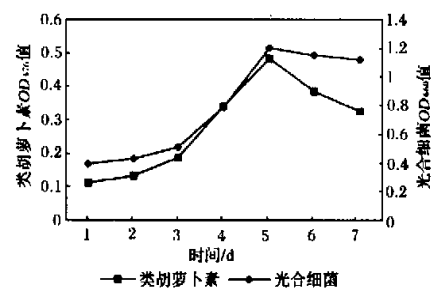


图 7 光合细菌和类胡萝卜素生长曲线

从图 7 可知,菌体在 0~5 d 处于生长初期和对数生长期,此时类胡萝卜素生长量和菌体生物量同步增长。进入稳定期后,细菌细胞自溶,不利于色素的回收,同时有部分色素分解。因此,初步确定发酵时间为 5 d。

2.9 正交实验

经过上述单因素碳源和氮源对类胡萝卜素生长的影响试验,确定了较为合适的碳源和氮源浓度。另外,考虑培养基 pH 对色素生成亦有一定的影响。为了进一步研究各主要因子之间的相关性,选取 NaAc、(NH₄)₂SO₄、pH 三因素三水平进行正交实验。实验安排和结果见表 1、表 2。

表 1 正交实验安排 L₉(3⁴)

水平	NaAc/%	(NH ₄) ₂ SO ₄ /%	pH 值
1	0.20	0.15	6
2	0.30	0.30	7
3	0.40	0.45	8

从表 2 可知,按极差大小决定因素的主次顺序:NaAc、(NH₄)₂SO₄、pH,各因素取类胡萝卜素生成最高水平,选定 0.3% NaAc、0.3% (NH₄)₂SO₄、pH7 为最好配合。

2.10 优化后实验

在上述研究的最适条件下,培养 5 d 后,色素 OD₄₇₆ 值可达 1.280。

表 2 正交实验结果分析

水平	NaAc	(NH ₄) ₂ SO ₄	pH	类胡萝卜素 OD ₄₇₆
1	1	1	1	0.640
2	1	2	2	0.850
3	1	3	3	0.576
4	2	1	2	1.130
5	2	2	3	1.182
6	2	3	1	0.710
7	3	1	3	0.794
8	3	2	1	1.002
9	3	3	2	0.890
K ₁	2.606	2.564	2.352	
K ₂	3.022	3.034	2.870	
K ₃	2.686	2.176	2.552	
k ₁	0.689	0.855	0.784	
k ₂	1.007	1.011	0.957	
k ₃	0.895	0.725	0.851	
R	0.318	0.286	0.173	

3 结 论

通过对光合细菌的发酵条件的优化,初步确定了该菌种产类胡萝卜素的最优碳源 NaAc 质量浓度为 0.3%、氮源 (NH₄)₂SO₄ 为 0.3%、C/N 为 1、MgSO₄ 质量浓度为 0.15 g/L,在培养温度为 30℃,光照度为 1 500 lx,接种量为 8%,pH 值为 7.0 左右,厌氧培养 5 d 后,类胡萝卜素 OD₄₇₆ 值可达 1.280,比优化前有较大的提高。在这种条件下,培养成本低,菌体生长快,类胡萝卜素含量相对较高,可与法夫酵母产类胡萝卜素相媲美^[8,9],这也为进一步研究该菌的发酵动力学和以后的产业化打下了基础。

参 考 文 献

1 小林正泰. 特许公报. 昭 52-9749, 1977
2 Krinsky N I. Clin. Nutr., 1988, 7: 107
3 王业勤, 李勤生. 天然类胡萝卜素——研究进展、生产、应用. 北京: 中国医药科技出版社, 1997. 250~292
4 Watterberg L W. Cancer Rec., 1983, 43: 2448~2459
5 Nicolay V D, Buane E V. Bioavailability of

Carotenoids. New York: Plenum Press, 1990. 226 ~

234

6 Omenn G S, Goodman G E, Thongquist M D
et al. New Eng. J. Med., 1996, 334:1150~1155

7 刘春朝, 欧阳藩. 生物技术, 1995, 5(3):22
~25

8 Fontana J D, Chocial M B, Baron M et al.

Applied Biochemistry and Biotechnology, 1997, 63/
65:305~314

9 Parajo J C, Santos V, Vazquez M. Process
Biochemistry, 1998, 33(2):181~187

Studies on Carotenoid Production with Fermentation Process by Photosynthetic Bacteria R_1

Gu Qing Liang Xinle Li Jianrong

(College of Food Science, Biotechnology and Environment Engineering,
Hangzhou University of Commerce, Hangzhou, 310035)

ABSTRACT The composition of fermentation medium and cultural conditions for carotenoid producing by photosynthetic bacteria R_1 were studied and optimized. Under the optimum conditions of NaAc 0.3% as carbon source, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3% as nitrogen source, Mg^{2+} 0.15 g/L, inoculum concentration 8%, pH 7.0, 1500 lx, and incubation at 30°C, after 5 days' fermentation, the absorption of carotenoids is 1.280 at 476 nm.

Key words photosynthetic bacteria, carotenoid, fermentation process optimization

你想降低煤耗吗?

请使用北京市宝达阀门厂生产的——

结构简单 维修方便
动作灵敏 热效率高
排水量大 漏气率低

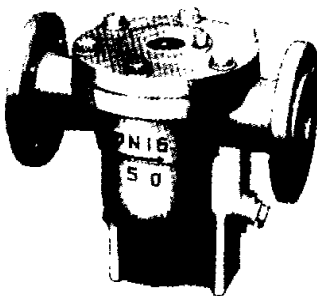
自由浮球式蒸汽疏水阀

规格: 15mm~100mm

温度: 170°C 200°C 250°C

压力: 0.6MPa 1.6MPa 4.0MPa

本厂未在其他地区设
立销售机构, 请用户直接
向本厂购货。



销售科地址: 北京丰台区马家堡东路 96 号

邮编: 100075

乘车路线: 从和平门乘 14 路公共汽车到西马场北口站下车即到

电话/传真: (010)87299231

节假日电话: (010)67578261

BP 机: (010)64675566 呼 5656

联系人: 韩宝润 开户行: 北京商业银行琉璃厂支行 75000

账号: 010903003001201010155-01