

交试验最优水平相比多培养 2h 后总活性达到最高。

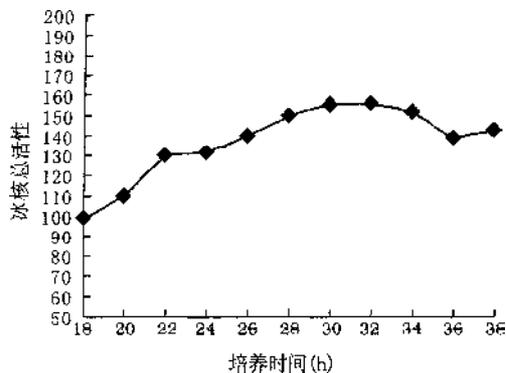


图2 培养时间和培养物冰核总活性关系曲线

3 结论

通过研究不同培养条件对草生欧文氏菌10025A冰核活性和菌体生物量的影响,发现 18℃低温诱导可以使得在高温下培养的冰核活性细菌的冰核活性有所提高,在保证获得较大生物量的同时也可以获得相对较高的冰核活性,这与有关文献报道是一致的^[1]。正交实验结果表明:培养时间对总活性影响最显著,其次为培养温度,再次为低温诱导,pH 值对总活性

的影响最小。在 MPDA 培养基中培养草生欧文氏菌 10025A,获得冰核活性和菌体生物量均较优的水平的最适发酵培养条件组合为培养温度 18℃,培养基 pH6.5,培养时间 32h,70ml 培养液中所获得冰核细菌的菌体湿重为 2.239g,冻滴率 70%,总活性为 156.73。

参考文献:

- [1] Fall A L, and Fall R. Current Micro. 1998, 36: 370-376.
- [2] Fields P G. J. store-Prod. Res., 1992, 28: 89-118.
- [3] Watanabe M, Arai S. J. Food Eng, 1994, 22: 453-473.
- [4] Kunmeno K, Nakahama N, Watanabe M. Biosci. Biotechnol. Biochem, 1994, 58: 447-450.
- [5] Jingkun Li, Martha P, Izquierdo, Tung-Ching lee. International Journal of Food Science and Technology., 1997, 32: 41-49.
- [6] 陈庆森,高秀芝等.食品与发酵工业,2001,27(1):8-12.
- [7] 中国科学院数学研究所统计组编.常用数理统计方法[M].科技出版社,1973.
- [8] 陈庆森,阎亚丽.微生物学能报,2000,27(6):421-424.
- [9] 张耀东,王钦宏.郑州粮食学院学报,1997,18(1):8-12.
- [10] 诸葛健,王正祥.工业微生物实验技术手册[M].北京:中国轻工业出版社,1997.
- [11] 孙福在.中国农业科学,1996,29(5):62-67.

小分子效应物对发酵法生产番茄红素的影响

王永生,袁其朋,秦敬改,钱忠明
(北京化工大学制药工程系,北京 100029)

摘要:利用三孢布拉氏霉菌发酵生产番茄红素具有较大的工业化生产潜力。本文主要考察了在小试过程中,不同小分子效应物对三孢布拉氏霉菌合成番茄红素的影响。结果表明:trinton-X100对菌体中番茄红素含量影响较小,span-20、-紫罗酮和异烟肼却可以提高番茄红素的产量。特别是添加 span-20 可使番茄红素含量提高 2 倍,达 98.6mg/L 发酵液。

关键词:三孢布拉氏霉菌;番茄红素;小分子效应物

Abstract: Fermentation is one of potential methods for producing lycopene industrially by *Blakeslea trispora*. The effect of the modulator on lycopene fermentation was investigated. The results showed that trinton-X100 had little effect on fermentation, but span-20 and -ionone could enhance the productivity of lycopene significantly. The content of lycopene in the medium reached 98.6mg/L by adding 1g/L span-20. The content was 3 times as much of the control experiments.

Key words: *Blakeslea trispora*; lycopene; matter

中图分类号:TS202.3

文献标识码:A

文章编号:1002-6630(2003)05-0097-04

番茄红素,一种具有 11 个碳碳共轭双键的类胡萝卜素。在所有的类胡萝卜素中,它是最强的单线

收稿日期:2002-10-13

作者简介:王永生(1978-),男,在读硕士研究生,研究方向:生物制品。

态氧淬灭剂,并具有抗氧化、防紫外辐射等功能。随着对其生理功能的研究发现,番茄红素不仅对前列腺癌、乳腺癌、以及胰腺癌等癌症的癌细胞具有抑制作用,而且对血管硬化和冠心病均有防治作用。因而番茄红素在食品、化妆品以及医药领域具有重要用途^[1]。

现在番茄红素的生产方法主要包括化学合成、天然提取法以及发酵法^[1]。而发酵法又包括基因工程菌发酵和非基因工程菌发酵,其中三孢布拉氏霉菌发酵展现了较好的工业化应用前景。本文主要对三孢布拉氏霉菌发酵过程中各种小分子效应物对番茄红素生产能力的影响进行研究。

1 材料与方法

1.1 大菌种

三孢布拉氏霉菌(*Blakeslea trispora*), ATCC(+)和 ATCC(-)。

1.2 培养基

种子培养基(g/L): 淀粉 40, 玉米浆 50, KH₂PO₄ 1, MgSO₄ 0.1, VB₁ 微量, 自来水定容, pH6.5。

发酵培养基(g/L): 淀粉 40, 大豆饼粉 20, 玉米浆 25, KH₂PO₄ 1, MgSO₄ 0.1, VB₁ 微量, 自来水定容, pH6.5。

1.3 培养条件

250ml 三角瓶, 装液量 40ml, 接种量 10% (1:1), 28℃, 250 r/min 培养 5d。

1.4 测定方法

1.4.1 菌体干重测定 45℃ 真空干燥, 恒重后称量。

1.4.2 番茄红素测定 紫外分光光度计。472nm 条件下测定吸光系数。

1.5 实验方法

发酵法生产番茄红素的流程如下:

斜面培养 → 种子培养^{48h}_{正负菌混合} → 发酵培养^{48h}_{添加阻断剂} → 抽滤

→ 真空干燥 → 石油醚萃取 → 皂化 → 真空浓缩

2 结果与分析

2.1 阻断剂添加量的确立

在工业化生产中,三孢布拉氏霉菌主要用于β-胡萝卜素的生产。但当在培养过程中添加含氮的杂环类化合物时,由于该类化合物抑制细胞内环化酶的活性,从而导致三孢布拉氏霉菌不能合成最终产物β-胡萝卜素,而合成大量的番茄红素^[2]。本组实验过程中,以吡啶做阻断剂,考察了吡啶不同添加量对

表1 不同吡啶添加量对发酵的影响

吡啶添加量 (ml/L)	菌体干重 (g/L)	番茄红素含量 (mg/g菌体干重)	番茄红素含量 (mg/L)
对照	52.8	0.057	3.00
1	48.8	0.489	23.9
2	52.6	0.652	34.3
5	47.2	0.546	25.8
12	24.9	0.042	1.05

发酵的影响。实验结果见表1。

从表中数据我们可以看出,当在发酵过程中添加吡啶作为阻断剂时,菌体中的番茄红素含量均明显高于对照组(不添加阻断剂),而且当添加合适剂量的阻断剂时,菌体中番茄红素的含量增加10倍。不过,当添加的吡啶剂量过低或过高时,菌体中番茄红素的含量均减少。特别是随着吡啶添加量的继续增加,番茄红素含量明显减少。这主要是由于吡啶具有一定的毒性,如果添加剂量太多,不仅会对菌体生长造成毒害,也会使得代谢途径发生变化。因而在后续实验中,吡啶的添加量为2ml/L。

2.2 表面活性剂对发酵的影响

在发酵液中添加适当的表面活性剂,不仅可以改变发酵液的流体特性,而且可以改变细胞的通透性,从而有利于物质传递。在实验过程中,我们主要选用了无离子型表面活性剂。它们分别是 triton-X100, span-20。triton-X100是不溶于水的,而span-20是可溶性的。两者的实验结果分别见表2和表3。

表2 triton-X100对发酵的影响

triton-X100 (ml/L)	菌体干重 (g/L)	番茄红素含量 (mg/g菌体干重)	番茄红素含量 (mg/L)
对照	48.8	0.589	28.7
1	62.6	0.585	36.6
2	24.9	0.056	1.39
5	0.00		

从表2中我们可以看出当添加 triton-X100 的剂量为1ml/L时,菌体干重显著提高,而菌体中番茄红素的含量并没有明显变化。但随着 triton-X100 的添加量的增加,菌体干重和菌体中番茄红素含量都明显下降。这可能是由于合适剂量的 triton-X100 对于发酵液的流体特性(比如粘度、流变型)有一定的改善,从而有利于菌体的生长,但对菌体中番茄红素的合成没有影响。不过,过高浓度的 triton-X100 对菌体生长具有毒害作用,当添加剂量超过5ml/L时,菌体全部死亡。

从表3可以看出,与对照组(未添加 span-20)相

表3 span-20对发酵的影响

span-20 (g/L)	菌体干重 (g/L)	番茄红素含量 (mg/g菌体干重)	番茄红素含量 (mg/L)
对照	48.1	0.673	32.4
1	50.8	1.94	98.6
2	54.0	1.25	67.5
4	54.2	0.336	18.2
10	45.0	0.044	1.98

比,当span-20添加计量为1ml/L、2ml/L时,菌体中番茄红素的含量提高2~3倍。但是,随着span-20添加量的增加,菌体中番茄红素的含量在逐步降低;不过,菌体干重并没有明显变化。因而,我们认为与triton-X100相比,span-20更加有利于发酵液流体特性和菌体通透性的改变。这可能与span-20的物化性质(水溶性)有关。而且在添加合适剂量的条件下,有利于菌体合成番茄红素,但当添加过量后,可能改变了菌体代谢途径,反而不利于番茄红素的合成。

2.3 -紫罗酮对发酵的影响

在三孢布拉氏霉菌发酵过程中,-紫罗酮作为前体在发酵过程中添加,可以提高-胡萝卜素的含量^[3]。因而,在本实验过程中,考察了当发酵进行48h时添加-紫罗酮(添加浓度0.1%),再分别在48、60、72、90h添加吡啶对番茄红素含量的影响。结果见表4。

表4 -紫罗酮对发酵结果的影响

-紫罗酮 (h)	吡啶 (h)	菌体干重 (g/L)	番茄红素含量 (mg/g菌体干重)	番茄红素含量 (mg/L)
未添加	48	50.1	0.685	34.3
48	48	54.1	0.711	38.5
48	60	54.2	1.34	72.6
48	72	52.4	1.54	80.7
48	90	51.5	0.895	46.1

从上述结果可以看出,当48h添加吡啶的同时添加-紫罗酮,并不会对最终番茄红素的含量造成影响;不过,在48h添加-紫罗酮以后的24h中添加吡啶却有利于番茄红素的合成。但随着吡啶添加时间的拖后,菌体中番茄红素的含量却下降。这主要是由于-紫罗酮是三孢布拉氏霉菌合成-胡萝卜素的前体,当添加-紫罗酮以后,它抑制了5-磷酸甲羟戊酸向-,二甲烯丙焦磷酸的转化反应,使得菌体合成大量的-胡萝卜素,而随后24h添加阻断剂只是阻断番茄红素合成-胡萝卜素的环化反应,并不抑制-紫罗酮的前体作用;但阻断剂添加时间过迟,

菌体虽然也会积累一定量的番茄红素,但主要合成的是-胡萝卜素。

2.4 异烟肼对发酵的影响

在研究过程中,人们发现在三孢布拉氏霉菌发酵生产-胡萝卜素的过程中,添加异烟肼同样可以促进细胞合成-胡萝卜素,其作用与-紫罗酮相似。不过,异烟肼是水溶性的,而-紫罗酮是油溶性的。我们也采用-紫罗酮相似的方法考察了异烟肼(添加浓度0.05%)对发酵的影响。

从上述结果可以看出,异烟肼对发酵的影响与-紫罗酮对发酵的影响相类似,但异烟肼对番茄红素生产的影响要比-紫罗酮的小。这可能是由于-紫罗酮促进三孢布拉氏霉菌合成-胡萝卜素的能力强于异烟肼的促进能力。

表5 异烟肼对发酵的影响

异烟肼 (h)	吡啶 (h)	菌体干重 (g/L)	番茄红素含量 (mg/g菌体干重)	番茄红素含量 (mg/L)
未添加	48	48.9	0.637	31.1
48	48	47.8	0.652	31.2
48	60	49.2	0.972	48.0
48	72	46.5	0.985	45.8
48	90	45.7	0.783	35.8

3 结 论

利用发酵法生产番茄红素是近来研究的热点之一。而在三孢布拉氏霉菌发酵生产番茄红素过程中,选择合适的阻断剂非常关键。当确立最佳的添加阻断剂剂量之后,考察一些小分子效应物对番茄红素生产的影响具有很重要的意义。对于表面活性剂来说,主要考察了span-20,triton-X100这两种非离子型表面活性剂对发酵的影响,span-20不仅可以改变发酵液流体特性和细胞通透性,而且更重要的是它是水溶性表面活性剂,更加有利于细胞内外物质的传递并营造有利于番茄红素合成的有利条件,因而可使番茄红素生产能力提高2倍达98.6 mg/L。而triton-X100是难溶于水的,虽然它也改变了发酵液的流体特性和细胞通透性,但其效果却并不明显。而对于-紫罗酮和异烟肼的添加来说,当48h添加-紫罗酮后,胞内代谢流向-胡萝卜素途径迁移,如果在合适时机添加阻断剂,可以提高番茄红素的含量2倍,但是,随着添加时间的推移,菌体中-胡萝卜素的含量越来越高。异烟肼的作用机理与-紫罗酮相似,不过,它的影响要小于-紫罗酮对发酵的影响。随后我们将继续研究这些小分子效应物对发酵的复合影响。

参考文献:

- [1] 王永生,袁其朋. 番茄红素生产工艺研究进展[J]. 微生物学通报, 2002, 29(2): 60-64.
- [2] V M Tereshina, E P Feofilova, A S Memorskaya et al.

- Effect of azines on lyloprene formation in the mycelial fungus *Blakeslea trispora*[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 1996, 32(4): 427-429.
- [3] 姜文侯, 单志萍, 孟好等. 胡萝卜素的应用: 市场和天然型产品的发酵法生产[J]. *食品与发酵工业*, 1994, (3): 65-71.

蜂胶黄酮提取方法研究

李维莉, 马银海, 彭永芳

(昆明师专天然产物研究所, 昆明 650031)

摘要: 设计正交实验, 采用水浴和超声分别对蜂胶中黄酮类物质的提取方法进行了研究。结果表明: 水浴法以25倍原料重的70%乙醇水溶液在75℃浸提1h为最佳, 超声法以20倍原料重的75%乙醇水溶液超声20min浸提为最佳, 超声法优于水浴法, 黄酮提取率高达45.6%。

关键词: 蜂胶; 黄酮; 正交实验; 超声法; 水浴法; 浸提

Abstract: Optimal conditions for the extraction of flavonoids from propolis with water bath and ultrasonic wave were studied by using orthogonal design. The results showed that the optimal conditions for the extraction with water bath were 75℃, 25:1 of 70% alcohol solution to propolis weight ratio and extraction for 1h. The optimal conditions with ultrasonic technique were 20:1 of 75% alcohol solution to propolis weight ratio and extraction for 20 minutes. So the ultrasonic technique used gave better results than water bath in this work. The content of flavonoids in the extraction liquid was as high as 45.5%.

Key words: propolis; flavonoids; orthogonal design; ultrasonic wave; water bath; extracting

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2003)05-0100-02

蜂胶(propolis)是蜜蜂采集杨树等植物新生枝芽的树脂并混入蜂蜡等分泌物而成的一种粘性物质。临床上具有抑菌消炎, 活血化瘀等作用, 能治疗多种疾病, 并且有天然的抗氧化性能和增强机体免疫功能。近年来研究表明, 蜂胶的生物学、药理学及医疗功效主要与蜂胶中所含黄酮成分有关, 其中, 它所含黄酮类化合物的种类、数量之多是其他天然植物所不及的^[1-3]。为了更好地开发利用蜂胶这一资源, 本文对蜂胶黄酮的提取做了一些基础性研究。

1 实验部分

1.1 主要仪器、试剂及材料

UV-1100型紫外分光光度计及其配套设备 北京瑞利分析仪器公司; BUG25 超声波发生器 上海必能信有限公司; 恒温水浴锅及回流冷凝装置 北京长安科学仪器厂; RE-52型旋转蒸发器 上海安亭电子仪器厂。

芦丁标准品 上海试剂一厂生化试剂; 无水乙醇、丙酮、甲醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠

等试剂均为分析纯。

蜂胶为昆明嵩明养蜂厂产品, 采集蜂种为意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligusica* Spinola。蜂胶冷冻后粉碎备用。

1.2 黄酮含量测定及计算

1.2.1 芦丁标准应用液配制 准确称取干燥恒重的芦丁标准品 0.0752g, 用 30% 乙醇溶解并定容 250ml, 摇匀得浓度为 0.3008g/L 标准溶液。

1.2.2 工作曲线的测定 分别取上述芦丁标准溶液 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0ml, 于 5 只 25ml 容量瓶中, 用 30% 乙醇补充至 12.5ml, 加入 1.0ml 5% 亚硝酸钠摇匀, 放置 5min 后加入 1.0ml 10% 硝酸铝, 6min 后加入 10ml 4% 氢氧化钠, 混匀, 用 30% 乙醇稀释至刻度, 10min 后于 500nm 处比色测定, 试剂为空白参比。

1.3 实验步骤

1.3.1 正交设计 在文献^[4,5]的基础上, 通过预试,

收稿日期: 2002-11-27

作者简介: 李维莉(1974-), 女, 硕士, 从事天然活性成分研究与开发。