

菌体形态对发酵法生产番茄红素的影响

王永生¹ 王见冬¹ 袁其朋^{1,2*} 秦敬改¹ 钱忠明²

(北京化工大学化学工程学院制药工程系 北京 100029)¹

(香港理工大学应用生物及化学科技学系 香港)²

摘要: 菌体形态是影响霉菌代谢的重要因素。主要考察了煤油和不同表面活性剂对三孢布拉氏霉菌菌体形态及番茄红素合成能力的影响。结果表明: 当添加煤油和 triton-X100 形成菌丝球时, 该菌丝形态不利于物质的传递, 细胞合成番茄红素的能力无明显变化。而当添加水溶性表面活性剂 span-20 时, 形成粗、短分散型的菌丝体, 强化了传质, 促进了番茄红素的合成, 番茄红素生产能力提高了近 3 倍。

关键词: 番茄红素, 菌体形态, 三孢布拉氏霉菌

中图分类号: TQ641 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2003) 06-0047-05

THE EFFECT OF MYCELIAL MORPHOLOGY ON LYCOPENE FERMENTATION

WANG Yong-Sheng WANG Jian-Dong YUAN Qi-Peng QIN Qing-Gai QIAN Zhong-Ming

(The Department of Chemical Engineering of Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029)¹

(Department of Chemistry Science and Applied Biology, Hong Kong Polytechnic University)²

Abstract: Mycelial morphology are exploited a great influence to the metabolites of fungi. The effect of the mycelial morphology on producing lycopene by *Blakeslea trispora* was investigated. The results indicated that pellets has little role on fermentation when adding kerosene and triton-x100, However, The content of lycopene in the medium reached to 98.6mg/L by adding 1g/L span-20, forming dispersed mycelia, which is 3 times of the control experiments.

Key words: Lycopene, Mycelial morphology, *Blakeslea trispora*

番茄红素是一种具有 11 个碳碳共轭双键的类胡萝卜素。近年来的研究表明, 番茄红素对单线态氧的淬灭作用是 β -胡萝卜素的 2 倍, 其抗氧化作用也明显优于 β -胡萝卜素; 同时它还具有诱导细胞间信息传递的作用。因而, 番茄红素在预防和治疗前列腺癌、乳腺癌以及心脑血管疾病方面具有巨大的潜力^[1]。与此同时, 番茄红素生产工艺的研究与开发也成为当前研究的热点。

利用三孢布拉氏霉菌生产 β -胡萝卜素生产技术较成熟, 并已在国内实现工业化生产。根据三孢布拉氏霉菌的代谢途径, 若在发酵过程中, 添加合适的阻断剂, 阻断番茄红素到 β -胡萝卜素的环化途径, 就可以积累大量的番茄红素^[1]。我们在研究中发现, 当添加煤油和不同的表面活性剂后, 三孢布拉氏霉菌呈现不同的菌体形态, 而这些菌丝形态与菌体番茄红素的合成能力密切相关。因此, 本文主要研究了煤油和不同表面活性剂对三孢布拉氏霉菌菌丝形态及番茄红素合成能力的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种

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

* 联系人 Tel: 010-64437610

收稿日期: 2002-12-05, 修回日期: 2003-10-15

1.2 培养基

种子培养基: 淀粉 40g, 玉米浆 50g, KH_2PO_4 1g, MgSO_4 0.1g, VB_1 0.01g, 自来水定容至 1L, pH6.5。

发酵培养基: 淀粉 40g, 大豆饼粉 20g, 玉米浆 25g, KH_2PO_4 1g, MgSO_4 0.1g, VB_1 0.01g, 自来水定容至 1L, pH6.5。

1.3 培养条件

250mL 三角瓶, 装液量 40mL, 接种量 10% (1: 1), 28℃, 250r/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 $\xrightarrow[正负菌混合]{48h}$ 发酵培养 $\xrightarrow[添加阻断剂]{48h}$ 抽滤 → 真空干燥 → 石油醚萃取 → 皂化 → 真空浓缩

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)	菌体形态
对照	52.8	0.057	3.00	菌丝聚集体
1	48.8	0.489	23.9	菌丝聚集体
2	52.6	0.652	34.3	菌丝聚集体
5	47.2	0.546	25.8	菌丝聚集体
12	24.9	0.042	1.05	菌丝聚集体

2 结果与分析

2.1 阻断剂添加量的确立

三孢布拉氏霉菌在工业生产中主要用于 β -胡萝卜素的_{生产}。但当在液体培养基中添加含氮的杂环类化合物时, 该化合物抑制细胞内环化酶的活性, 阻断番茄红素到 β -胡萝卜素的环化反应, 诱导菌体合成大量的番茄红素。在本实验中, 我们以吡啶为阻断剂, 考察了吡啶不同添加量对发酵的影响。实验结果见表 1。

从表 1 可以看出, 当在发酵过程中添加吡啶后, 菌体中番茄红素的含量明显高于

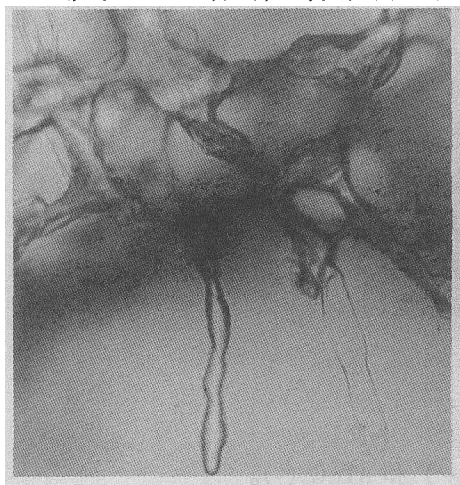


图 1 菌丝显微照片 ($\times 640$)

对照组, 而且当添加量为 2mL/L 时, 菌体中番茄红素的含量提高了近 10 倍。但随着吡啶添加量的增加, 菌体中番茄红素的含量会逐渐减少。当吡啶添加量为 12 mL/L 时, 菌体中番茄红素的含量低于对照组, 菌体的生产也受到抑制, 表明过量的吡啶不仅对菌体生长有毒害作用, 而且对菌体的代谢途径产生了负面影响。从显微照片可以看出, 此时的菌体主要是以细、长且有较多分支的菌丝形成的聚集体的形式存在 (见图 1)。而这种聚集体的形态并不利于物质的传递。而对霉菌来说, 不同的菌体形态会对次级代谢产生不同的影响。因而, 我们考察了添加不同表面活性剂对菌体形态及番茄红素含量

的影响。

2.2 煤油对发酵的影响

对于霉菌发酵来说,当生物量较高时,发酵液属于非牛顿型流体,由于传质不均,只有少部分菌体处于最佳的生长条件。因而,改变发酵过程中的

表 2 煤油对发酵的影响

添加时间 (h)	添加量 (mL/L)	菌体干重 (g/L)	番茄红素 (mg/g)	番茄红素 (mg/L)	菌体形态
0	50	51.4	0.052	2.67	松散型菌丝球
0	100	23.1			松散型菌丝球
对照	0	48.8	0.589	28.7	细菌丝聚集体

培养条件可望改善细胞与底物和氧之间的传递特性^[2]。比如,在发酵液中添加合适的碳氢化合物或表面活性剂可以改变菌体形态,形成菌丝球;而提高搅拌转速或添加加速效碳、氮源利于形成松散菌丝。因而在实验过程中,首先考察了煤油对菌体形态和发酵的影响。结果见表 2。

从表 2 可以看出,煤油的添加使得菌体形成菌丝球,但菌体中番茄红素的含量仍很低,而且菌丝球的

表 3 不同煤油添加时间对发酵的影响

添加时间 (h)	添加量 (mL/L)	菌体干重 (g/L)	番茄红素含量 (mg/g)	番茄红素 (mg/L)	菌体形态
对照	0	44.4	0.60	26.6	菌丝聚集体
24	50	47.8	0.489	23.4	松散型菌丝球
24	100	29.6	0.036	1.07	松散型菌丝球
48	50	42.0	0.72	30.2	松散型菌丝球
48	100	45.6	0.15	6.84	松散型菌丝球
72	50	42.8	0.68	29.1	松散型菌丝球
72	100	29.6	0.11	3.25	松散型菌丝球

直径大于 4mm。从显微照片中,我们发现

在菌丝球中央的菌丝体是白色,而菌丝球外层为橙黄色。这表明处于菌丝球中央的细胞未能合成番茄红素。这主要是由于较大的菌丝球阻碍了底物与氧向菌丝球中心的传递,菌丝球内部由于营养物质缺乏导致不能合成番茄红素。另一方面,在培养前添加的煤油可能也会对菌体产生毒害作用,进而改变了细胞的代谢途径^[3]。为此,我们继续考察了不同煤油添加时间对发酵的影响。结果见表 3。

从表 3 可以看出,在发酵进行 24h 至 72h 间,添加煤油 (50mL/L) 不会对菌体生长和番茄红素合成造成负面影响。这的确说明发酵前添加煤油会对菌体产生毒害,但随着添加时间延迟,煤油也未明显提高菌体合成番茄红素的能力。从形成的菌丝球的照片 (见图 2) 来看,与上组实验不同之处仅仅是菌丝球直径在 1mm 左右,但其中央菌丝体依旧呈现白色。表明菌丝球内部的传质与传氧限制了番茄红素的合成。

2.3 triton-X100 对发酵的影响

当在发酵液中添加合适的表面活性剂,不仅可以改善发酵液的流变特性和细胞通透性,而且,就霉菌来说,还可以形成均一、紧密的菌丝球。因此,我们选择了非离子型表面活性剂 triton-X100,考察它对发酵的影响。其结果见表 4。



图 2 添加煤油菌体形态

表4 triton-X100对发酵的影响

添加量 (mL/L)	菌体干重 (g/L)	番茄红素含量 (mg/g)	番茄红素含量 (mg/L)	菌体形态
对照	48.8	0.589	28.7	菌丝聚集体
1	62.6	0.585	36.6	紧密型菌丝球
2	24.9	0.056	1.39	松散型菌丝球
5	0.00			

没有影响,而且随着 triton-X100 添加量的增加,细胞合成番茄红素的能力下降。这主要是由于过量的 triton-X100 会对菌体造成毒害,引起菌体自溶的结果。

从上述3组结果可以说明菌丝球这种菌体形态对于发酵法生产番茄红素是不合适的。Hemmersdoerfer 等^[4]认为发酵液中的养分和氧不能有效传递会诱导菌体形成菌丝球,并据此提出限制型假说。根据我们的研究结果,添加煤油和 triton-X100 后,发酵液的流变特性并没有得到有效改善,使得三孢布拉氏霉菌在发酵培养基中形成的菌丝球不利于目标产物的合成。

表5 span-20对发酵的影响

添加量 (g/L)	菌体干重 (g/L)	番茄红素含量 (mg/g)	番茄红素含量 (mg/L)	菌体形态
对照	48.1	0.673	32.4	菌丝聚集体
1	50.8	1.94	98.6	粗、短分散型菌丝
2	54.0	1.25	67.5	粗、短分散型菌丝
4	54.2	0.336	18.2	粗、短分散型菌丝
10	45.0	0.044	1.98	粗、短分散型菌丝

而,我们考察了 span-20 对发酵的影响。结果见表5。

从菌丝形态而言,span-20 使菌丝生长减缓,形成短、粗且分支少的分散型菌丝体(见图3,图4)。在 span-20 添加量合适的条件下,这种菌丝形态大大提高了三孢布拉氏

当 triton-X100 的添加量为 1mL/L 时,菌体形成紧密型菌丝球(直径 < 1mm),虽然该菌丝形态对于细胞的生长是有利的(菌体干重 62.6 g/L),但对细胞内番茄红素的合成能力却

2.4 span-20对发酵的影响

span-20 是一种非离子型表面活性剂, Takahashi 等^[5]报道 span-20 不仅可以消除菌体凝集形成的菌丝球,还可以促进细胞的生长和代谢产物的合成。因



图3 菌丝显微照片(×640)

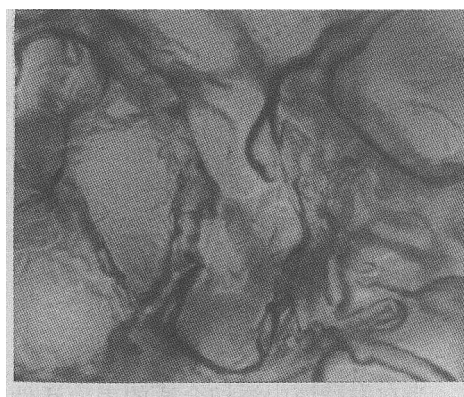


图4 添加 span-20 菌体形态(×640)

霉菌合成番茄红素的能力,使其产率提高了3倍。这主要是由于菌丝在分散条件下能与底物和氧有效接触,提高了传质效率。同为非离子型表面活性剂, triton-X100 和 span-20 的结果却大相径庭。我们认为这可能是由于 span-20 是水溶性表面活性剂的结果。它有效地改善了发酵液的流变特性和细胞的通透性,强化了传质。而 triton-X100 是油溶性的,不具备这样的功能。

3 结论

在三孢布拉氏霉菌发酵生产番茄红素的过程中, 不同的表面活性剂诱导菌体产生不同的形态。当添加水溶性的表面活性剂 span-20 时, 菌体形成有利于番茄红素合成的分散型菌丝体, 番茄红素的含量提高了 3 倍。而当添加煤油和 triton-X100 时, 菌体形成菌丝球, 该菌丝形态不利于物质的传递, 三孢布拉氏霉菌合成番茄红素的能力无明显变化。

参考文献

- [1] 王永生, 袁其朋. 微生物学通报, 2002, **29** (2): 60 ~ 64.
- [2] Sergei B, Susan E V L. Tibtech-February, 1991, **9**: 63 ~ 68.
- [3] Alex C, George E N, Harlow H H. Appl Microbiol, 1962, **10**: 132 ~ 136.
- [4] Hemmersdoerfer H L, Wardsack C, Ruttloff H. J Basic Microbiology, 1987, **27**: 309 ~ 315.
- [5] Takahashi J A Y, Yamada K. J Agric Chem Soc, 1960, **34**: 1043 ~ 1045.

浙江榨菜病毒病病原鉴定

施曼玲

(杭州师范学院生命科学学院 杭州 310012)

摘要: 从浙江桐乡和海宁的花叶或叶片皱缩、植株矮化的榨菜 (*Brassica juncea* Coss) 上分离毒源, 摩擦接种 5 种鉴别寄主, 在鉴别寄主上都出现不同症状; 间接酶联免疫吸附法 (Indirect ELISA) 检测, 芜菁花叶病毒 (*Turnip mosaic virus*, TuMV) 的检出率为 87.5%, 黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 为 73.08%, 两者复合侵染率为 65.38%, 所有的样本都没有检测到烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV); IC-RT-PCR 扩增, 分别得到约 0.85kb 和 0.7kb 的两条条带, 与预期的 TuMV 和 CMV 的 CP 基因大小吻合。CP 基因序列测定也表明: 所克隆产物是属于 TuMV 和 CMV 的 CP 基因。根据以上试验结果判断: 浙江榨菜病毒病主要是由 TuMV、CMV 以及 TuMV 和 CMV 复合侵染引起。

关键词: 榨菜, 芜菁花叶病毒, 黄瓜花叶病毒, 病毒病

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 06-0051-05

PATHOGEN IDENTIFICATION OF MOSAIC VIRUS DISEASE OF *BRASSICA JUNCEA* COSS IN ZHEJIANG

SHI Man-Ling

(Coll. Of Life Science, Hangzhou Teachers College, Hangzhou 310012)

Abstract: The virus isolates were collected from *Brassica juncea* Coss whose symptom was mosaic, stunt and distorted in Tongxiang and Haining, in Zhejiang province. The isolates could infect five identification hosts and produced different symptoms. The results of indirect ELISA test indicated that the specimens infected by *Turnip mosaic virus* (TuMV) accounted for 87.5% of the total. 73.08% and 65.48% of the total specimens were infected by *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) and TuMV + CMV complex, respectively. All specimens didn't infected by *Tobacco mosaic virus* (TMV).

* 浙江省自然科学基金项目 (No.301007)

收稿日期: 2003-01-07, 修回日期: 2003-05-20