添加氧载体及表面活性剂对番茄红素发酵的影响*

朱 艳 袁其朋** 王 航

(北京化工大学制药工程系 北京 100029)

摘要：通过添加氧载体（正十二烷、正己烷、过氧化氢），有效改善发酵体系中的氧传递速率，从而促进了三孢布拉氏霉菌合成番茄红素的能力。实验结果表明，在第0d加入1.0%的正己烷、正十二烷时番茄红素的生成量分别提高了25.32%、72.84%，在第1d，添加50μL/100mL过氧化氢时番茄红素的生成量提高了40.35%，在加入正十二烷的同时，再加入表面活性剂Triton-x100，Tween20，Tween80，Span-20等，可使番茄红素的产量最多提高114.83%。

关键词：番茄红素，氧载体，过氧化氢，氧传递速率，表面活性剂

中图分类号：TQ920.1 **文献标识码**：A **文章编号**：0253-2654（2006）01-0090-04

Enhancement of Lycopene Production by *Blakeslea trispora* Using Oxygen-vectors and Surface Active Agents*

ZHU Yan YUAN Qi-Peng** WANG Hang

(*College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing* 10029)

Abstract: Addition of oxygen-vectors (n-dodecane, n-hexane, hydrogen peroxide) to fermentation medium was recognized as a method of enhancing oxygen transfer and promoting lycopene yield by *Blakeslea trispora* fermentation. Higher lycopene production was observed in shake flask containing 1% (v/v) n-hexane, n-dodecane and 150 L/100mL hydrogen peroxide as compared to shake flasks without oxygen-vectors. The result of assays indicated that when oxygen-vectors (n-dodecane, n-hexane, 1%, v/v) and hydrogen peroxide (50 L/100mL) were added to the 0-day and 1-day old culture of *Blakeslea trispora* the production of lycopene were 25.32%, 72.84% and 40.35% higher than those without oxygen-vectors addition respectively. The production of lycopene increased 114.83% when n-dodecane and surface active agents were used at the same time.

Key words: Lycopene, Oxygen-vectors, Hydrogen peroxide, Oxygen transfer rate, Surface active agents

番茄红素是一种脂溶性类胡萝卜素，具有增强免疫、清除自由基、抗氧化、防治多种癌症等重要的生理功能，从而成为近年的研究热点之一。三孢布拉氏霉菌（*B. trispora*）是世界上最常用的β-胡萝卜素高产菌株。根据其代谢途径，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。但是三孢布拉氏霉菌（*B. trispora*）属于高度嗜氧嗜粘度的微生物，所使用的培养基粘度大、固型物含量高，生长过程中容易纠结成团，致使发酵系统的溶氧速率较低，如加大搅拌，剪切力将增大，则会造成菌丝体的损伤，生产能力下降。

有文献报道[1]，加入诸如煤油、正己烷、正十二烷等氧载体后，可提高同一反应

*国家自然科学基金资助（No. 20326007）
Project Granted by Chinese National Science Fund (No. 20326007)

**通讯作者 Tel：010-64437610，E-mail：yuanqp@mail.buct.edu.cn

收稿日期：2005-04-19，**修回日期** 2005-05-24

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

系统的 K_{La}（传氧系数）值 30% ~300%，或达到同一混和效果降低搅拌功率 30% 以上的优点，目前国内外尚未见有氧载体用于发酵生产番茄红素的报道，而发酵法生产番茄红素对发酵液溶氧水平的要求很高，故研究氧载体对于发酵生产番茄红素的影响有着重要的意义。

增加溶氧目前有两种方法，一是添加氧载体，氧载体（oxygen - vectors）是一种与水不互溶、对微生物无毒、具有较高溶氧能力的有机物。液态烷烃、正十二烷、正己烷等均可作为氧载体[1~6]；二是在水相中用化学的方法产生氧气，即：用过氧化氢/过氧化氢酶系统或者通过直接向发酵液中添加过氧化氢增加溶氧[1,2,7]。氧载体发酵体系由于具有氧传递速度快，能耗低，气泡生成少，剪切力小等特点，因此受到人们的重视。本文主要研究了不同氧载体及表面活性剂在 *B trispora* 发酵生产番茄红素过程中的应用，探讨了氧载体在相应发酵体系中的作用。

1　材料与方法

1.1　菌株

见参考文献 [8]。

1.2　培养基与培养方法

见参考文献 [8]。

1.3　试 剂

正十二烷、正己烷、过氧化氢；Triton-X100、Tween20、Tween80、Span20。

1.4　分析方法

番茄红素含量测定：高效液相色谱法（HPLC）。HPLC 分离柱为 Diamonsil C_{18}，5μm，250mm × 4.6mm；流动相为乙腈与二氯甲烷体积比为 75 ： 25；检测波长为 450nm；柱温 28℃；流速 1.5mL/min。

样品处理：因为番茄红素为胞内产物，所以在用 HPLC 测定前，需要将菌体碾磨提取番茄红素。实验中取 0.1g 发酵所得干菌体研磨后，用石油醚萃取，过滤后定容于 25mL 棕色容量瓶中，并添加 0.05g 抗氧化剂 BHT。

2　实验结果与讨论

2.1　不同氧载体加入时间对发酵的影响

使用氧载体的时间应该是发酵体系出现溶氧限制时，此时加入氧载体可以解除溶氧不足的限制，提高发酵生产能力。分别在 0，1，2，3，4 d 加入 1.5%（v/v）的正己烷、正十二烷，30μL 的 H_2O_2 到发酵液中，发酵结束后使用高效液相色谱（HPLC）测定番茄红素的含量以确定氧载体的最优加入时间。实验结果见图 1。由图 1 可见，相对于对照 250.63mg/L 的番茄红素产量，在第 0d 加入 1.5mL 的正十二烷和正己烷分别可以使番茄

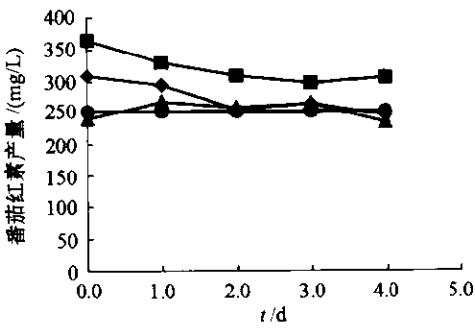

图 1　不同氧载体对发酵的影响

◆ 正己烷，■ 正十二烷，▲ H202，● 对照

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

红素产量提高23.41%和45.87%；而加入30μL的H_2O_2最多可以使番茄红素产量提高6.40%。可见选择正十二烷作为氧载体的效果最佳。Jae-Cheol Jeong等[6]报道H_2O_2可以刺激β-胡萝卜素的合成。实验表明：加入H_2O_2确实可以提高番茄红素产量。由图1可见正己烷、正十二烷与H_2O_2的最优添加时间不同，这可能是由于H_2O_2具有强氧化性，若在发酵起始阶段加入会毒害菌体，因此其最优添加时间为第1d。

2.2　氧载体不同添加量对发酵的影响

在发酵第0d向发酵液中分别加入不同量的正己烷、正十二烷，在第1d时加入不同量的H_2O_2，以确定它们的最优添加量。结果见图2，3。

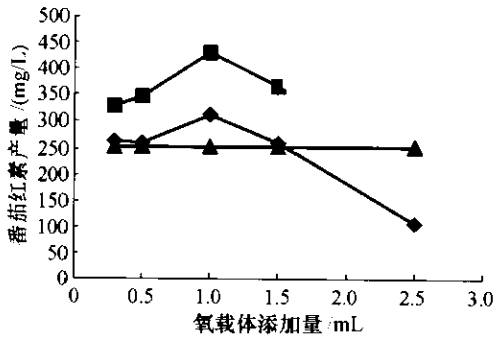

图2　氧载体不同添加量对发酵的影响

◆ 正十二烷，■ 正己烷，▲ 对照

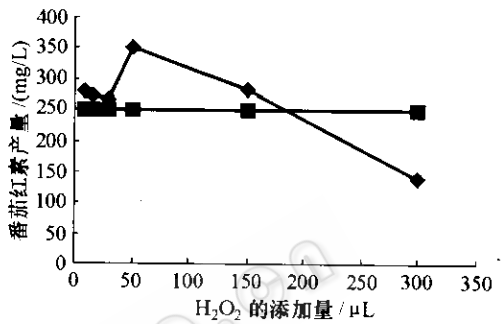

图3　过氧化氢添加对发酵的影响

◆ H_2O_2，■ 对照

从图2，图3可见随着氧载体添加量的增大，番茄红素产量先是随之增大，然后又减小，正己烷、正十二烷、H_2O_2番茄红素产量最多分别可以提高25.32%、72.84%、40.35%。正己烷与正十二烷的最优添加量为1%（v/v），H_2O_2的最优添加量为50μL/100mL。究其原因可能是因为液态烷烃起到了分散剂的作用，使细胞间的絮凝性降低，分散的较小菌丝团与大菌丝团相比，界面面积增加了，因而增加了氧传递到菌丝体内的总速度[14]。而H_2O_2促进番茄红素产量提高可能有如下两个原因：一是在发酵液中分解产生氧气，二是添加H_2O_2可以刺激积累番茄红素[7]。但是过多的添加有机溶剂及H_2O_2会对菌体产生毒害作用，不利于积累番茄红素，过少则对番茄红素产量提高的效果很不明显。

2.3　加入氧载体的同时添加不同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。实验中我们主要选用了Triton-X100，Span-20，Tween-20，Tween-80。分别考察添加氧载体和与表面活性剂同时添加对发酵的影响。结果见图4。

由图4可见单独添加正己烷和正十二烷与对照相比番茄红素产量分别可以提高46.27%和66.35%，添加表面活性剂可使番茄红素产量的提高5.2%～67.23%，它们在刺激番茄红素生成方面的效果为：Tween80 > Span20 > Triton-X100 > Tween20；而同时添加氧载体和表面活性剂可以大量提高番茄红素的产量，同时加入Tween80和正十二烷与同时加入Tween80和正己烷最高分别可使番茄红素产量提高114.83%和59.48%。表面活性剂对发酵产生的促进作用原理尚不很清楚，一般认为其作用在于改善细胞的通透性，增大细胞膜的通过能力，增加胞内胞外的物质平衡，改善通气效果[9]。实验

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

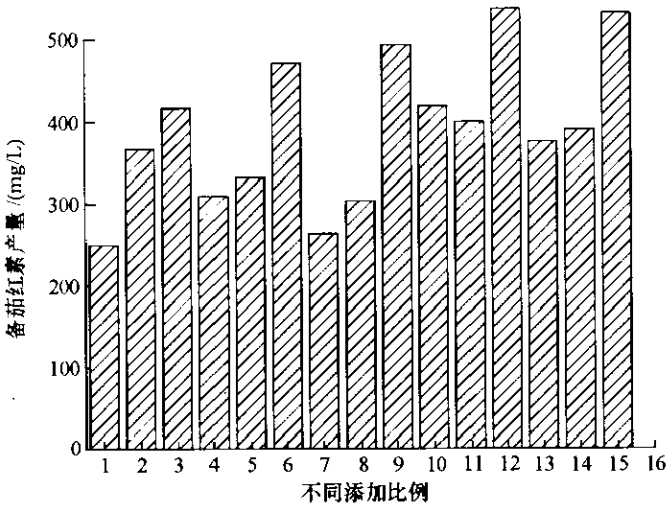

图 4　氧载体与表面活性剂同时添加对发酵得影响

注：表面活性剂的添加量为 0.1% (w/v)，氧载体添加量为 1% (v/v)，二者同时添加为 0.1% 表面活性剂及 1% 氧载体

1 空白，2 正己烷，3 正十二烷，4 Triton - X100，5 Triton - X100 + 正己烷，6 Triton - X100 + 正十二烷，7 Tween20，8 Tween20 + 正己烷，9 Tween20 + 正十二烷，10 Tween80，11 Tween80 + 正己烷，12 Tween80 + 正十二烷，13 Span20，14 Span20 + 正己烷，15Span20 + 正十二烷

结果表明添加 Tween80 作用效果最佳，可能是因为 Tween80 更加有利于改变发酵液流体特性和菌体通透性。在添加合适的剂量的条件下，有利于菌体合成番茄红素。同时加入表面活性剂和氧载体在改进细胞通透性的同时又可以增加溶氧，所以可使番茄红素产量提高的更多。

3　结论

(1) 最优氧载体为正十二烷，最优添加时间为第 0d，最优添加量为 1% (v/v)。番茄红素产量最多可提高 72.84%。氧载体的最适添加时间为：正己烷，正十二烷第 0d，H_2O_2 第 1d。最优添加量分别为正己烷，正十二烷 1% (v/v)，H_2O_2 50μL/100mL。

(2) 在使用氧载体的同时，添加表面活性剂可以大量提高番茄红素的产量，其中添加 Tween80 结果最佳。表面活性剂添加量为 0.1% (w/v)，番茄红素产量最多可提高 114.83%。

参 考 文 献

[1] Wang J L, Process Biochemistry, 2000, **35**: 1079 ~ 1083.
[2] Giridhar R, Srivastva A K. Enzyme and Microbial Technology, 2000, **27**: 537 ~ 541.
[3] 贾士儒，李小明，包志泉，等. 天津轻工业学院学报，1994，**1**：7 ~ 12.
[4] 贾士儒，袁玉华，包志泉，等. 天津轻工业学院学报，1995，**1**：1 ~ 7.
[5] 贾士儒，食品与发酵工业，1997，**23** (1)：7 ~ 10.
[6] Jae C, In Y L, Seon W K *et al.*, Biotechnology Letters, 1999, **21**: 683 ~ 686.
[7] 王永生，袁其朋. 食品科学，2003，**24** (5)：97 ~ 100.
[8] 王永生，王见冬，袁其朋，等. 微生物学通报，2003，**30** (6)：47 ~ 51.
[9] Schlegel H G, Ibrahim H G. Biotechnol Bioeng, 1980, **22**: 1894 ~ 977.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn