

# 光合细菌培养基组成对类胡萝卜素产量的影响\*

陈德明 韩永斌 顾振新\*\*

(南京农业大学农业部农畜产品加工与质量控制重点开放试验室 南京 210095)

**摘要:** 采用响应面法对光合细菌培养基主要成分进行了优化, 研究了培养基组成对类胡萝卜素产量的影响。经过逐步回归分析建立了类胡萝卜素产量对培养基主要成分的二次回归模型, 其回归方程的决定系数达到了 0.958。得到的最适培养基主要组成为: 0.81% 柠檬酸、0.35%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  和 0.18% 玉米浆, 类胡萝卜素产量最大预测值达到 13.34mg/L, 是优化前的 2.04 倍。

**关键词:** 光合细菌, 培养基, 类胡萝卜素, 响应面法

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 03-0011-07

## Effects of Components of Medium for Photo-synthetic Bacteria on its Synthesizing Carotenoid\*

CHEN De-Ming HAN Yong-Bin GU Zhen-Xin\*\*

(Key Laboratory of Agricultural and Animal Products Processing and Quality Control, Ministry of Agriculture, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095)

**Abstract:** The medium of photo-synthetic bacteria synthesizing carotenoid was optimized with response surface methodology. The regression equation expressing the relationship between carotenoid yield and main components of culture medium was established by stepwise analysis. The R-squared in the model of regression equation was 0.958, which meant the established equation could predict the carotenoid yield well at the range of factors in this design. It was indicated that the optimum medium components were: 0.81% citric acid, 0.35%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and 0.18% corn syrup. On those conditions, it was predicted that the highest production of carotenoid was 13.34 mg/L, which was 2.04 times higher than initial carotenoid yield before optimization.

**Key words:** Photo-synthetic bacteria, Medium, Carotenoid, Response surface methodology

类胡萝卜素是自然界存在的一类重要色素, 目前已知结构的类胡萝卜素近 600 种, 其中约有 40 多种可为人类食用<sup>[1]</sup>。FAO 和 WHO 等国际组织认定类胡萝卜素为 A 类营养色素, 并在 50 多个国家和地区获准作为营养、着色双重功能的添加剂, 因而被广泛用于保健食品及化妆品工业。光合细菌 (Photo-synthetic bacteria) 是生产类胡萝卜素的主要微生物之一, 迄今发现可由其合成的类胡萝卜素已超过 80 种<sup>[2]</sup>。利用光合细菌发酵生产天然类胡萝卜素因生产周期短、不受季节限制而备受重视<sup>[3]</sup>。色素提取后的菌体中富含蛋白质、氨基酸和维生素等, 可作为单细胞蛋白加以利用。光合细菌培养基组成对类胡萝卜素产量的影响目前主要采用单因素研究, 而对影响其产量的诸因素交互作用缺乏研究。本文采用响应面法对光合细菌培养基主要成分进行了优化, 研究培养基组成对类胡萝卜素产量的影响, 以期为深入研究和规模化生产类胡萝卜素提供依据。

\* 江苏省高新技术项目 (No. BG2004323)

\*\* 通讯作者 Tel: 025-84396293, E-mail: guzx@njau.edu.cn

收稿日期: 2005-08-15, 修回日期: 2005-09-20

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种来源

光合细菌：由南京工业大学生物技术中心提供。

### 1.2 基础培养基组成

苹果酸 2.5g, 酵母膏 1g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.25g,  $\text{MgSO}_4$  0.2g,  $\text{CaCl}_2$  0.07g,  $\text{FeSO}_4$  0.01g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15g, 用蒸馏水溶解并定容至 1L, pH 7.0。

### 1.3 培养方法

按 10% 接种量将活化后的液体种子接种于新鲜的液体培养基中, 在培养温度为 28℃、光照强度 1,500 lx (TES-1330 照度计测得) 和厌氧条件下培养 5d。

### 1.4 试验设计

**1.4.1 单因素试验：**对基础培养基分别进行碳源、氮源和生长因子替代物筛选和水平优化。待筛选的 8 种碳源分别为乙酸钠、苹果酸、柠檬酸、葡萄糖、乳糖、蔗糖、酒石酸和可溶性淀粉, 浓度范围为 0.05% ~ 1.50%; 待筛选的 6 种氮源分别为  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{NaNO}_3$ , 谷氨酸钠和玉米浆, 浓度范围为 0.05% ~ 2.00%; 待筛选的 5 种生长因子替代物分别为酵母膏、牛肉膏、蛋白胨、胰蛋白胨和玉米浆, 浓度范围为 0.02% ~ 0.20%。

**1.4.2 响应面试验：**根据单因素试验结果, 以柠檬酸、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  和玉米浆浓度为 3 因素, 进行中心组合响应面设计, 以类胡萝卜素产量为响应指标。通过 Design expert 软件对实验数据进行回归分析, 预测光合细菌用于生产类胡萝卜素的最佳培养基。试验设计见表 7。

### 1.5 测定方法

**1.5.1 菌体产量：**在 Maria 等<sup>[4]</sup>的基础上加以改进。菌液在 10,000 r/min 条件下离心 20 min, 弃去上清液, 菌体用蒸馏水洗涤两次后再次离心。所得菌体在 65℃ 下烘干至恒重。

**1.5.2 类胡萝卜素产量：**在王岁楼等<sup>[3]</sup>的基础上加以改进。菌体加入浓度为 3 mol/L 的盐酸, 28℃ 下振荡 1.5 h 后沸水浴 4 min, 迅速冷却, 10,000 r/min 离心 20 min 弃上清液, 沉淀用双蒸水洗涤 2 遍。在所得菌体中加入丙酮, 28℃ 水浴振荡浸提 30 min, 10,000 r/min 冷冻离心 20 min, 取上清液。适当稀释类胡萝卜素提取液, 于 480 nm 处测定吸光值。按以下公式计算类胡萝卜素产量。

$$\text{类胡萝卜素产量 (mg/L)} = A \cdot D V_1 / 0.16 V_2$$

式中:  $A$ ——480 nm 处吸光值;  $D$ ——稀释倍数; 0.16——类胡萝卜素消光系数;  $V_1$ ——加入的提取剂体积;  $V_2$ ——用于提取色素的发酵液体积。

## 2 结果与分析

### 2.1 碳源筛选及水平优化

**2.1.1 碳源筛选：**当培养基分别以苹果酸或柠檬酸为碳源时, 菌体产量和类胡萝卜素产量最大, 两者之间无显著差异 (表 1)。这是因为光合细菌对有机酸及其盐类的利用程度要高于糖类物质。由于苹果酸价格是柠檬酸的 4 ~ 5 倍, 生产上宜用柠檬酸作为碳源。

表 1 碳源对菌体产量和类胡萝卜素产量的影响

| 指 标       | 碳 源 (%)  |         |          |          |         |          |          |          |
|-----------|----------|---------|----------|----------|---------|----------|----------|----------|
|           | 乙酸钠      | 苹果酸     | 柠檬酸      | 酒石酸      | 葡萄糖     | 乳 糖      | 蔗 糖      | 可溶性淀粉    |
| 菌体产量      | 1.171    | 1.250   | 1.042    | 0.791    | 0.312   | 0.671    | 0.421    | 0.921    |
| (g/L)     | ±0.160ab | ±0.100a | ±0.061ab | ±0.211cd | ±0.052f | ±0.121de | ±0.121ef | ±0.062bc |
| 类胡萝卜素     | 4.05     | 6.52    | 6.31     | 4.28     | 0.62    | 1.75     | 0.63     | 4.75     |
| 产量 (mg/L) | ±0.25c   | ±0.35a  | ±0.19a   | ±0.21c   | ±0.01e  | ±0.17d   | ±0.02e   | ±0.23b   |

注：碳源浓度均为 0.25%；不同字母表示处理间在 0.05 水平上差异显著

2.1.2 柠檬酸水平优化：培养基中柠檬酸在 0.05% ~ 1.50% 浓度范围内时，光合细菌菌体产量和类胡萝卜素产量最高时的柠檬酸浓度为 0.6% ~ 0.8%（表 2）。柠檬酸浓度过低时造成碳源供应不足，浓度过高时则表现出明显的抑制作用。

表 2 柠檬酸浓度对菌体产量和类胡萝卜素产量的影响

| 指 标     | 柠 檬 酸 (%) |        |        |        |        |        |        |         |
|---------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
|         | 0.05      | 0.15   | 0.25   | 0.40   | 0.60   | 0.80   | 1.00   | 1.50    |
| 菌体产量    | 0.54      | 0.63   | 1.21   | 1.88   | 2.50   | 2.71   | 2.42   | 1.25    |
| (g/L)   | ±0.07d    | ±0.00d | ±0.07c | ±0.00b | ±0.12a | ±0.07a | ±0.51a | ±0.25c  |
| 类胡萝卜素产量 | 1.17      | 2.13   | 3.85   | 7.10   | 8.98   | 9.10   | 5.75   | 1.80    |
| (mg/L)  | ±0.43f    | ±0.58e | ±0.32d | ±0.37b | ±0.62a | ±0.29a | ±0.50c | ±0.23ef |

2.2 氮源筛选及水平优化

2.2.1 氮源筛选：由表 3 可知，光合细菌既能利用氨盐和硝酸盐等无机氮源，也能利用氨基酸以及玉米浆等有机氮源，NH<sub>4</sub>Cl 为氮源时菌体产量和类胡萝卜素产量均达最大值，分别比 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 为氮源时高出 40.00% 和 57.43%。

表 3 氮源对菌体产量和类胡萝卜素产量的影响

| 指 标     | 氮 源 (%) |         |         |         |         |         |  |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--|
|         | 氯化铵     | 硫酸铵     | 亚硝酸钠    | 硝酸钠     | 谷氨酸钠    | 玉米浆     |  |
| 菌体产量    | 2.625   | 1.875   | 0.917   | 1.750   | 1.875   | 1.792   |  |
| (g/L)   | ±0.102a | ±0.270b | ±0.212c | ±0.102b | ±0.102b | ±0.118b |  |
| 类胡萝卜素产量 | 7.79    | 4.95    | 2.07    | 4.91    | 5.78    | 5.91    |  |
| (mg/L)  | ±0.20a  | ±0.04c  | ±0.15d  | ±0.63c  | ±0.39b  | ±0.43b  |  |

注：氮源浓度均为 0.125%。

2.2.2 NH<sub>4</sub>Cl 水平优化：菌体产量和类胡萝卜素产量均随 NH<sub>4</sub>Cl 浓度增加呈先上升后下降的趋势，两者达最大时的 NH<sub>4</sub>Cl 浓度为 0.3%（表 4）。

表 4 NH<sub>4</sub>Cl 浓度对菌体产量和类胡萝卜素产量的影响

| 指 标     | NH <sub>4</sub> Cl (%) |          |         |          |          |          |          |          |
|---------|------------------------|----------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
|         | 0.05                   | 0.10     | 0.30    | 0.50     | 0.70     | 1.00     | 1.50     | 2.00     |
| 菌体产量    | 1.875                  | 2.000    | 2.250   | 1.750    | 1.625    | 1.459    | 1.375    | 1.500    |
| (g/L)   | ±0.153bc               | ±0.144ab | ±0.153a | ±0.088cd | ±0.088cd | ±0.059de | ±0.088de | ±0.153de |
| 类胡萝卜素产量 | 6.00                   | 6.13     | 7.35    | 2.19     | 2.28     | 0.99     | 0.48     | 0.47     |
| (mg/L)  | ±0.06b                 | ±0.05b   | ±0.31a  | ±0.05c   | ±0.05c   | ±0.13d   | ±0.02e   | ±0.03e   |

2.3 天然复合物筛选及水平优化

2.3.1 天然复合物筛选：5 种天然复合物均可作为光合细菌提供生长因子，其中以酵母

膏和玉米浆的效果最佳(表5),由于玉米浆是玉米深加工过程中的副产物,来源广,价格低,生产上可考虑用它取代酵母膏。

表5 天然复合物对菌体产量和类胡萝卜素产量的影响

| 指 标           | 天然复合物(%)     |              |              |              |              |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|               | 酵母膏          | 牛肉膏          | 蛋白胨          | 胰蛋白胨         | 玉米浆          |
| 菌体产量(g/L)     | 2.400±0.173a | 2.417±0.144a | 1.800±0.087b | 2.083±0.144b | 2.500±0.250a |
| 类胡萝卜素产量(mg/L) | 10.06±0.15a  | 8.97±0.08b   | 7.52±0.03c   | 6.56±0.10d   | 9.94±0.05a   |

注:天然复合物浓度均为0.1%

2.3.2 玉米浆水平优化:培养基玉米浆浓度为0.02%~0.20%时,光合细菌以在含0.10%玉米浆培养基中培养时所得的菌体产量和类胡萝卜素产量最大(表6)。

表6 玉米浆浓度对菌体产量和类胡萝卜素产量的影响

| 指 标           | 玉米浆浓度(%)     |              |              |              |               |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
|               | 0.02         | 0.04         | 0.06         | 0.10         | 0.20          |
| 菌体产量(g/L)     | 2.307±0.080b | 2.333±0.103b | 2.350±0.108b | 2.750±0.204a | 2.500±0.204ab |
| 类胡萝卜素产量(mg/L) | 10.33±0.09c  | 10.19±0.04c  | 10.30±0.24c  | 11.86±0.11a  | 11.11±0.11b   |

2.4 类胡萝卜素产量响应面优化

固定培养基中的无机盐组成,对柠檬酸(A)、NH<sub>4</sub>Cl(B)和玉米浆(C)浓度进行3因素5水平响应面分析试验,结果见表7。

表7 响应面分析方案与实验结果

| 试验号 | 柠檬酸(%)     | 氯化铵(%)     | 玉米浆(%)     | 类胡萝卜素产量(mg/L) |       |
|-----|------------|------------|------------|---------------|-------|
|     |            |            |            | 实际值           | 预测值   |
| 1   | -1(0.2)    | -1(0.1)    | -1(0.02)   | 3.06          | 2.27  |
| 2   | 1(1)       | -1         | -1         | 3.31          | 2.85  |
| 3   | -1         | 1(0.5)     | -1         | 2.58          | 3.95  |
| 4   | 1          | 1          | -1         | 2.63          | 3.00  |
| 5   | -1         | -1         | 1(1.8)     | 3.56          | 3.29  |
| 6   | 1          | -1         | 1          | 11.56         | 10.29 |
| 7   | -1         | 1          | 1          | 4.63          | 5.18  |
| 8   | 1          | 1          | 1          | 9.75          | 10.64 |
| 9   | -1.5(0)    | 0(0.3)     | 0(1)       | 1.00          | 0.44  |
| 10  | 1.68(1.27) | 0          | 0          | 2.69          | 2.99  |
| 11  | 0(0.6)     | -1.5(0)    | 0          | 5.25          | 7.27  |
| 12  | 0          | 1.68(0.64) | 0          | 9.75          | 8.00  |
| 13  | 0          | 0          | -1.25(0)   | 7.81          | 7.44  |
| 14  | 0          | 0          | 1.68(0.23) | 12.63         | 12.69 |
| 15  | 0          | 0          | 0          | 11.25         | 11.50 |
| 16  | 0          | 0          | 0          | 11.75         | 11.50 |
| 17  | 0          | 0          | 0          | 11.25         | 11.50 |
| 18  | 0          | 0          | 0          | 11.88         | 11.50 |
| 19  | 0          | 0          | 0          | 11.50         | 11.50 |
| 20  | 0          | 0          | 0          | 11.50         | 11.50 |

类胡萝卜素产量方差分析表明（表 8），对类胡萝卜素产量所建立的回归模型极显著（ $P<0.01$ ），柠檬酸和玉米浆浓度对菌体产量均有显著影响，且两者之间交互作用显著，而柠檬酸和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  浓度之间，以及  $\text{NH}_4\text{Cl}$  和玉米浆浓度之间的交互作用不显著。

以类胡萝卜素产量为响应指标，利用 Design Expert 软件对表 7 进行二次多元回归拟合，得到类胡萝卜素产量对编码自变量 A、B 和 C 的二次多项回归方程。

$$Y=11.50+1.51\cdot A+0.51\cdot B+2.17\cdot C-3.91\cdot A^2-1.54\cdot B^2-0.87\cdot C^2-0.38\cdot A\cdot B+1.60\cdot A\cdot C+0.051\cdot B\cdot C$$

回归诊断表明，决定系数（ $R^2$ ）=0.958，信噪比（Adequate precision）=14.81。这表明方程的拟合度和可信度均很高，可用于预测类胡萝卜素产量。

表 8 类胡萝卜素产量回归模型方差分析

| 变异来源           | 平方和    | 自由度 | 均 方    | F 值 /  | P 值     |
|----------------|--------|-----|--------|--------|---------|
| 模型             | 315.98 | 9   | 35.11  | 25.67  | <0.0001 |
| A              | 29.53  | 1   | 29.53  | 21.59  | 0.0009  |
| B              | 3.35   | 1   | 3.35   | 2.45   | 0.1488  |
| C              | 55.26  | 1   | 55.26  | 40.41  | <0.0001 |
| A <sup>2</sup> | 188.74 | 1   | 188.74 | 138.01 | <0.0001 |
| B <sup>2</sup> | 29.34  | 1   | 29.34  | 21.45  | 0.0009  |
| C <sup>2</sup> | 7.72   | 1   | 7.72   | 5.64   | 0.0389  |
| AB             | 1.18   | 1   | 1.18   | 0.87   | 0.3739  |
| AC             | 20.57  | 1   | 20.57  | 15.04  | 0.0031  |
| BC             | 0.02   | 1   | 0.02   | 0.02   | 0.9034  |
| 残差             | 13.68  | 10  | 1.37   |        |         |
| 总变异            | 329.66 | 19  |        |        |         |

$R^2 = 0.958$ , Adjusted  $R^2 = 0.921$ , Adequate Precision = 14.81

由图 1 可知，在玉米浆浓度为 1% 时，柠檬酸和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  浓度之间交互作用不显著；随着柠檬酸和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  浓度的增大，类胡萝卜素产量均呈现先上升后下降的趋势。这表明，适当增加培养基的柠檬酸和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  含量有利于提高类胡萝卜素产量。

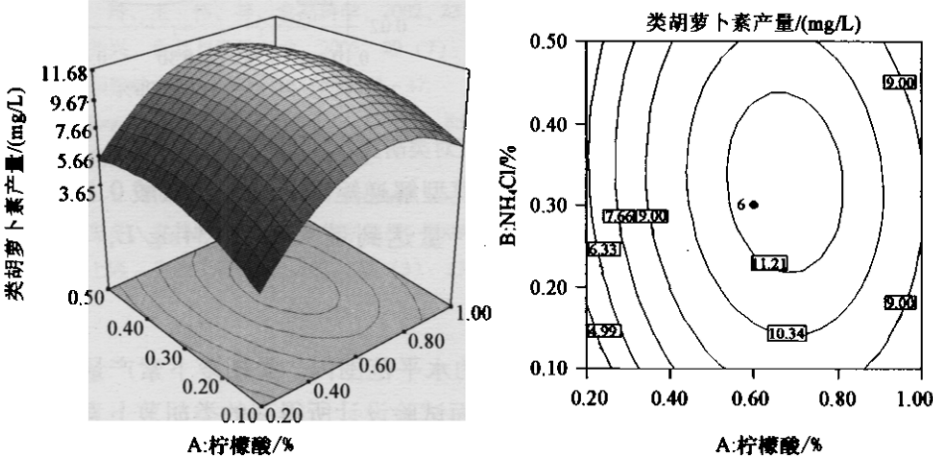


图 1 柠檬酸和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  浓度对类胡萝卜素产量的影响

柠檬酸和玉米浆浓度之间的交互作用极显著, 当玉米浆浓度较低时, 适当提高柠檬酸浓度可大幅提高类胡萝卜素产量, 而当柠檬酸浓度达最佳水平后, 玉米浆浓度的增加仍有利于增加类胡萝卜素产量 (图 2)。

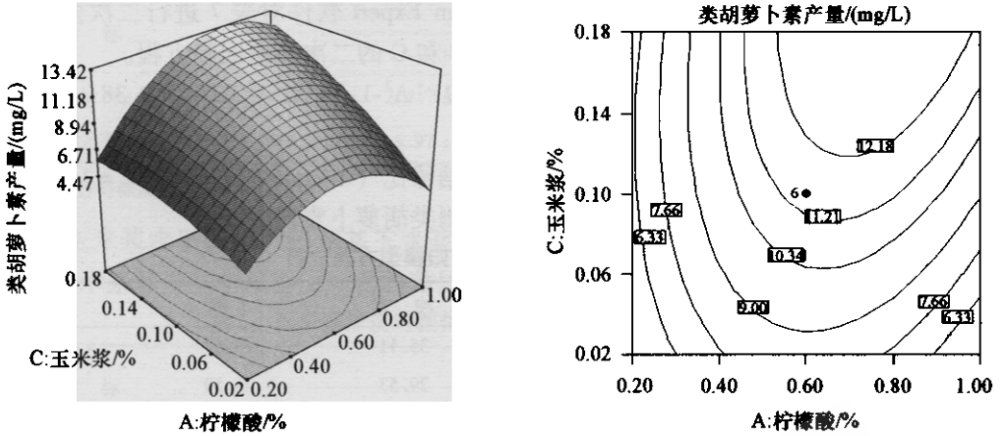


图 2 柠檬酸和玉米浆浓度对类胡萝卜素产量的影响

当玉米浆浓度较低时,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  浓度对类胡萝卜素产量影响不大; 当玉米浆浓度大于 0.15 % 时, 类胡萝卜素产量随  $\text{NH}_4\text{Cl}$  浓度增加呈先上升后下降的趋势。当  $\text{NH}_4\text{Cl}$  浓度不变时, 类胡萝卜素产量随玉米浆浓度增加而增加 (图 3)。

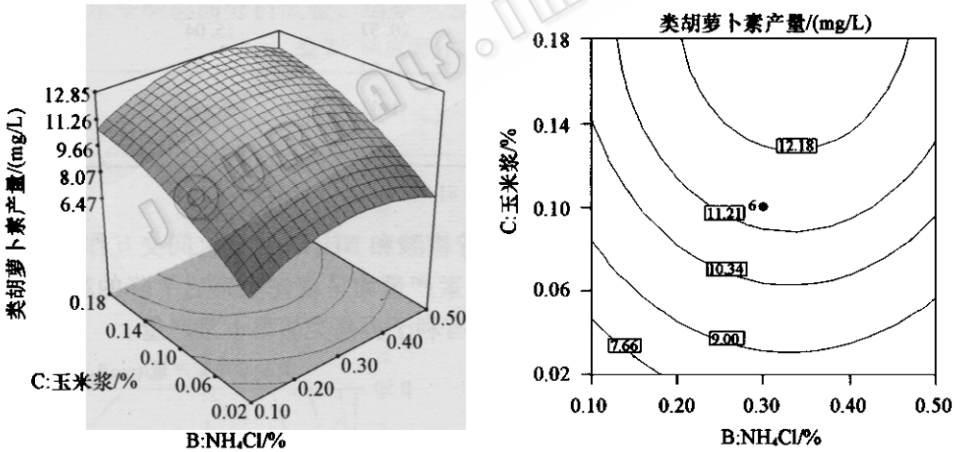


图 3  $\text{NH}_4\text{Cl}$  和玉米浆浓度对类胡萝卜素产量的影响

通过对类胡萝卜素产量的二次多项数学模型解逆矩阵, 得出柠檬酸 0.81%、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.35% 和玉米浆 0.18% 时, 类胡萝卜素产量达到最大值 13.34mg/L, 比优化前的 6.52mg/L (表 1) 提高了 103.66%。

## 2.5 验证性试验

验证性试验结果表明, 在响应面优化的水平范围内, 类胡萝卜素产量实际值和预测值拟合程度较好 (表 9), 因此运用响应面试验设计所得到的类胡萝卜素产量方程具有很强的预测性, 对实践生产具有指导意义。

表 9 验证试验结果

| 处 理     |         |         | 类胡萝卜素产量 (mg/L) |       |
|---------|---------|---------|----------------|-------|
| 柠檬酸 (%) | 氯化铵 (%) | 玉米浆 (%) | 实际值            | 预测值   |
| 0.6     | 0.1     | 0.10    | 10.75          | 9.49  |
| 0.6     | 0.3     | 0.18    | 12.38          | 12.77 |

3 讨论

苹果酸和柠檬酸等有机酸可直接参与光合细菌体内的三羧酸循环,因而苹果酸和柠檬酸等碳源比较适于光合细菌生长,这有利于类胡萝卜素产量的快速增加,但有机酸浓度过高时,发酵液形成的高渗透压对光合细菌细胞产生胁迫作用,抑制某些酶的活性<sup>[5]</sup>。光合细菌能利用的氮源种类很多,本研究结果表明以 NH<sub>4</sub>Cl 为氮源,并且浓度为 0.35% 时,光合细菌的类胡萝卜素产量最高。NH<sub>4</sub>Cl 可阻抑光合细菌的产氢过程,有利于获得较多菌体,从而提高类胡萝卜素产量,这与 Maria 等<sup>[4,6]</sup>的研究结果相符。但 NH<sub>4</sub>Cl 浓度过高会使培养液形成高渗透压,影响光合细菌正常生理代谢。培养基中玉米浆含量适当时,可增加类胡萝卜素产量,这与王永生等<sup>[7]</sup>报道的玉米浆可促进三孢布拉氏霉菌合成类胡萝卜素的结论一致。玉米浆除了能为光合细菌提供足够的生长因子和微量元素外,还能提供丰富的有机碳源和氮源。此外,玉米浆中的玉米黄素自身就是类胡萝卜素之一<sup>[8]</sup>,培养过程中玉米黄素可转化成类胡萝卜素的前体物质,从而促进胞内类胡萝卜素的合成。

随着科学技术的发展,食用合成色素因其对人体健康的危害而将逐渐被淘汰。FDA 已开始阻止使用并宣布最终将完全禁止使用合成红色色素,其他国家也纷纷禁用相应的合成色素。利用光合细菌发酵得到的类胡萝卜素既是天然色素,又具有一定营养价值。因此,采用光合细菌发酵法生产类胡萝卜素能有效解决人类对色素的大量需求与其安全性之间的矛盾。

参 考 文 献

[1] 仓一华,陆 玲,王 伟,等,食品科学,2002,23 (6): 34~38.  
[2] 范永仙,许尧兴. 食品与发酵工业,2003,29 (7): 69~74.  
[3] 王岁楼. 中国粮油学报,2001,16 (5): 43~47.  
[4] Barbosa M, Jorge R. Journal of Biotechnology, 2001, 85: 25~33.  
[5] 俞俊棠. 生物工艺学,2003,6: 101~108.  
[6] Harun K, Inci E. International Journal of Hydrogen Energy, 2002, 27: 1315~1329.  
[7] 王永生,王见冬,袁其朋,等. 微生物学通报,2003,30 (6): 47~51.  
[8] 陶 俊,张上隆. 生物工程学报,2002,18 (3): 276~281.