

文章编号:1673-1689(2007)02-0097-05

表面活性剂和抗氧化剂对三孢布拉霉合成 β -胡萝卜素的影响

刘海丽, 余晓斌

(江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 三孢布拉霉(*Blakeslea trispora*)是发酵生产天然 β -胡萝卜素的优良菌种。实验研究了乳化剂 OP、Span 20、Tween 80 3种非离子型表面活性剂对三孢布拉霉合成 β -胡萝卜素的影响,确定了三者的最佳作用浓度分别为 0.075%、0.05%和 1%, β -胡萝卜素产量的最大增长幅度分别为 15%、10%和 50%。抗氧化剂 Ethoxyquin 对 β -胡萝卜素产量的增长有显著作用,最佳浓度为 0.025%, β -胡萝卜素产量的增长幅度可高达 70%。

关键词: β -胡萝卜素; Span 20; Tween 80; 乳化剂 OP; 抗氧化剂; 三孢布拉霉

中图分类号: Q 562

文献标识码: A

Influences of Surfactants and Antioxidant on β -carotene Synthesis by *Blakeslea trispora*

LIU Hai-li, YU Xiao-bin

(School of Biotechnology, Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Effects of three nonsurfactants and one antioxidant on β -carotene synthesis by *Blakeslea trispora* were studied. Among the three non-ionogenic surface-active compounds, the best effect was produced by Tween-80. Addition of 1% Tween 80 to the fermentation broth could increased the amount of β -carotene by 50%. Similar results also achieved by Triton X-100(0.075%) and Span 20(0.05%), the β -carotene level by concentration increased 15% and 10%, respectively. As an antioxidant, ethoxyquin could protect β -carotene from oxidation. Addition of 0.025% ethoxyquin could enhance the β -carotene production by 70%.

Key words: β -carotene; Span 20; Tween 80; Triton X-100; antioxidant; *Blakeslea trispora*

β -胡萝卜素是重要的维生素 A 的前体,并具有较强的抗氧化作用,在食品、保健品、化妆品以及医药领域具有重要用途^[1]。三孢布拉霉是发酵生产

β -胡萝卜素的优良菌种^[2],在对该菌的摇瓶发酵过程中,菌丝体的形态对 β -胡萝卜素的产量影响重大。同时,利用该菌发酵产 β -胡萝卜素,需要在发

收稿日期:2005-11-02.

基金项目:江南大学青年科学基金资助项目(101000-52210468).

作者简介:刘海丽(1975-),女,河北邯郸人,工程师,工学硕士,主要从事生物化学及分子生物学方面的研究工作.

通讯作者:余晓斌(1965-),男,安徽芜湖人,教授,博导,主要从事酶工程及分子生物学方面的研究. Email: xbya@

sytu.edu.cn

醇培养基中添加大量植物油,可高达10%,但实验中我们发现植物油并不能被很好地利用。因此考虑添加表面活性剂,一方面,利用表面活性剂的两亲性性质,改变微生物细胞膜的通透性和细胞表面的极性,从而可以改变菌丝体的形态和菌丝体的聚集形态,因而改变微生物生理学性质和发酵液的流变特性,刺激生长和呼吸,增加相应产物的量;另一方面,利用表面活性剂的乳化作用,以增大油水界面,提高该菌的脂肪酶活力,促进菌体对植物油的分解和利用,提高 β -胡萝卜素的产量。

表面活性剂由极性亲水基和非极性疏水基组成,按其亲水基不同可分为离子型和非离子型两大类^[3]。非离子型表面活性剂在水中不电离,稳定性高,不易受酸碱作用和电解质影响。因此我们选择乳化剂 OP、Span 20、Tween 80 3 种非离子型表面活性剂,研究其对三孢布拉霉合成 β -胡萝卜素的影

响。另外,我们还考察了抗氧化剂对 β -胡萝卜素产量的影响。 β -胡萝卜素为类萜化合物,其结构中含有许多双键,因此对氧很敏感,为了提高 β -胡萝卜素的产量,我们选择在发酵后期向培养基中加入抗氧化剂 Ethoxyquin,观察其对 β -胡萝卜素的保护作用。

1 材料与方 法

1.1 菌种

三孢布拉霉(*Blakeslea trispora*):正菌 95+,负菌 96-,作者所在实验室保存。

1.2 化学试剂

乳化剂 OP、Span 20、Tween 80:中国医药集团上海化学试剂公司产品(化学纯);

Ethoxyquin:Fluka(生化试剂)

1.3 培养基

液体种子培养基:黄豆粉 5%,玉米粉 2.5%, VB_1 0.000 5%。

发酵培养基:黄豆粉 3%,玉米粉 1.8%,柠檬酸 1.2%,葡萄糖 0.15%,玉米浆粉 0.075%, KH_2PO_4 0.3%, $MgSO_4 \cdot H_2O$ 0.025%,棉籽油 10%, VB_1 0.000 2%,NaOH 调 pH 值 7.0。

1.4 培养条件

正菌和负菌分别接入种子培养基,27℃,180 r/min,培养 44 h;以 10%的接种量(正菌:负菌/1:4)接入发酵培养基,27℃,180 r/min 培养 144 h。

1.5 β -胡萝卜素提取和测定

菌丝体抽滤,于 40℃~50℃干燥 4~6 h,研磨

后加入石油醚(沸程 60~90℃)萃取 3~5 次,450 nm 比色测定,光吸收系数 $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 250$ 。

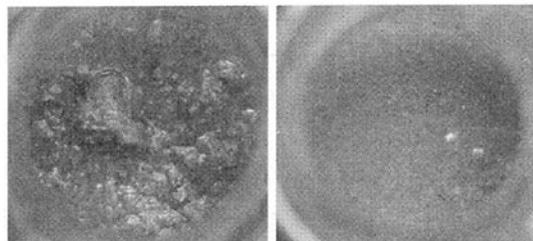


图 1 (a)对照菌体结块;(b)添加表面活性剂菌体均匀分散

Fig. 1 Effect of surfactants on the *Blakeslea trispora* morphology (a) The control; (b) by surfactants

2 结果与讨论

2.1 表面活性剂对菌丝体形态和聚集形态的影响

表面活性剂由极性亲水基和非极性疏水基组成,在微生物培养基中添加合适的表面活性剂可以改变微生物细胞膜的通透性和细胞表面的极性,因而改变菌丝体的形态和菌丝体的聚集形态。

与对照组相比,添加了 3 种表面活性剂的培养基中,菌丝体的形态和聚集形态都发生了改变,在各自合适的浓度下,都可使菌丝分散比较均匀,呈絮状,显微镜下可见菌丝较短。添加乳化剂 OP 的培养基中,当 OP 浓度 $>0.15\%$,菌丝体开始形成分散的小菌丝球。

2.2 表面活性剂对 β -胡萝卜素发酵的影响

表面活性剂对 β -胡萝卜素发酵的影响主要分为两个方面。

首先合适的表面活性剂可以改变微生物细胞膜的通透性和菌丝体的聚集形态,从而改变微生物的生理学性质和发酵液的流变特性,影响生长和呼吸,继而影响 β -胡萝卜素的产量。

其次,作为微生物的一种次级代谢产物, β -胡萝卜素与微生物的脂肪代谢途径紧密相关。在 β -胡萝卜素发酵培养基中经常以高比例的植物油作为碳源,因此微生物分解和利用油脂的效率对 β -胡萝卜素产量有很大影响。脂肪酶(Lipase, EC3. 1. 1. 3, 甘油酯水解酶)是一类特殊的酯键水解酶,催化如下反应:甘油三酯+水=甘油+游离脂肪酸。微生物分解和利用油脂的效率取决于其脂肪酶活力的高低,因此为了提高 β -胡萝卜素的产量,应设法提高脂肪酶的活力。脂肪酶的一个重要特征是只作用于异相系统,即在油(或脂)-水界面上作用,对均匀分散的或水溶性底物作用极弱,也即脂

肪酶在油水界面上催化活力最大。表面活性剂大多具有乳化作用,因此添加合适的表面活性剂,可以促进植物油乳化,增大油水界面,提高脂肪酶的活力,从而促进植物油的分解利用。除此之外,据报道 Tween、Span 等非离子表面活性剂还能显著促进微生物脂肪酶的产生^[4]。

根据以上原因,我们选择了 3 种非离子型表面活性剂 OP、Span 20 和 Tween 80,研究其对三孢布拉霉合成 β -胡萝卜素的影响。

2.2.1 乳化剂 OP 对 β -胡萝卜素发酵的影响 乳化剂 OP,别名 Triton-X 100^[5],化学结构为辛基苯基聚氧乙烯醚,可溶于水,属于亲油性乳化剂,为 O/W 型乳化剂,可以把油滴分散到水中形成水包油型乳状液,连续相是水。实验研究了 OP 浓度从 0~0.2% 范围内对三孢布拉霉发酵产 β -胡萝卜素的影响,结果见图 2。OP 在浓度低时主要表现为对菌体量及 β -胡萝卜素产量的促进作用,浓度高时则主要表现为对菌体的毒害作用,表现为菌体自溶, β -胡萝卜素产量及菌体量均下降。OP 作用的最佳浓度为 0.075%~0.1%,此时, β -胡萝卜素产量的增长幅度可达 15% 以上。

分析以上结果的原因有以下两方面:一,在添加 OP 的培养基中,菌丝体形态发生了改变。OP 使菌丝体较为分散,改善了营养物质和氧的传递,有利于细胞生长,发酵的生物量得到提高。但是随着 OP 浓度的提高,菌丝体会聚集形成紧密的菌丝球,由于菌丝球内部传质受到了限制,难以有效地合成产物,不利于胡萝卜素产量的提高。同时作为表面活性剂,OP 对微生物也表现出一定的毒害作用。二,OP 能促进植物油的乳化,增强脂肪酶的活力,促进菌体对植物油的分解利用,从而提高 β -胡萝卜素产量。图 2 所示的结果正是以上两综合作用的结果。

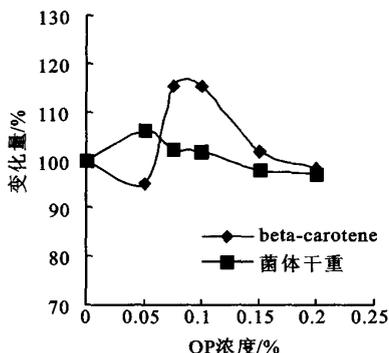


图 2 OP 对发酵的影响

Fig. 2 Effect of Triton-X100 on β -carotene fermentation

2.3 Span 20 对 β -胡萝卜素发酵的影响

Span 20,失水山梨醇单月桂酸酯,不溶于水,能溶于热油、脂肪酸及各种有机溶剂^[6];属于 W/O 型乳化剂,可以把水滴分散到油中形成油包水型乳状液,连续相是油。Span 20 对 β -胡萝卜素产量的影响与 OP 相似,结果见图 3。当 Span 20 浓度低时对三孢布拉霉发酵产 β -胡萝卜素有一定的促进作用,浓度高时则表现为抑制作用, β -胡萝卜素产量下降。Span 20 最佳浓度为 0.05%,此时促进作用最大, β -胡萝卜素的产量可提高 10%。

分析其原因与 OP 类似,一方面,添加 Span 20 后菌丝体比较分散,不易聚集在一起形成大的菌丝球,从而改善了发酵液的传质特性,有利于氧及营养物质的传递,促进 β -胡萝卜素的合成。同时,Span 20 也能促进植物油的乳化,增强脂肪酶的活力,促进菌体对植物油的分解利用,从而提高 β -胡萝卜素产量。另一方面,作为表面活性剂,Span 20 对微生物也表现出一定的毒害作用。当 Span 20 浓度过高(大于 0.1%),菌体自溶, β -胡萝卜素产量及菌体量均下降。图 3 中的菌体干重曲线正是 Span 20 对菌体的毒性作用与促进作用平衡的结果。

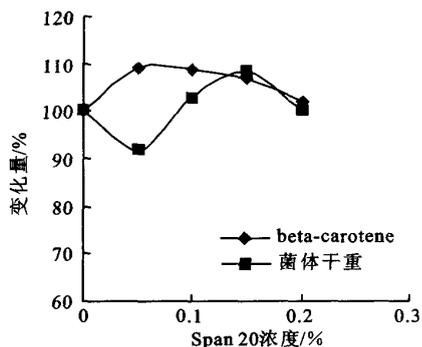


图 3 Span 20 对发酵的影响

Fig. 3 Effect of span 20 on β -carotene fermentation

另外,Span 20 较 OP 的作用稍弱,可能是二者的乳化作用类型不同所致,O/W 型乳化剂可能更有利于促进三孢布拉霉发酵生产 β -胡萝卜素。

2.4 Tween 80 对 β -胡萝卜素发酵的影响

Tween 80,化学结构为聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯,同 OP 一样属于 O/W 型乳化剂^[7],能溶于水及多种有机溶剂,不溶于油。文献报道在黑曲霉的果胶裂解酶培养基中添加 0.1% 的 Tween 80,能将产酶量提高 70%^[8]。

实验发现 Tween 80 对 β -胡萝卜素合成的促进作用与乳化剂 OP 和 Span 20 显著不同。添加 Tween 80 的培养基中,菌丝体的分散程度不如添

加 OP 和 Span 20 的培养基,因此在图 4 中表现出菌体干重并不增加,但 Tween 80 对油的乳化效果比 OP 和 Span 20 好,因此对 β -胡萝卜素的促进效果更为明显。另外,乳化剂 OP 和 Span 20 在 0.1% 以上即对菌体表现出毒性,使 β -胡萝卜素产量下降,而 Tween 80 在很高浓度时仍表现为促进作用,最佳作用浓度为 1%, β -胡萝卜素产量的增长幅度最高可达 50% 以上。

与乳化剂 OP 和 Span 20 相比,Tween 80 对三孢布拉霉发酵产 β -胡萝卜素的促进作用最为显著,分析其原因可能是三者的结构不同所致:Tween 80 的结构中亲油基是油酸(聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯),而 Span 20 的亲油基是月桂酸(失水山梨醇单月桂酸酯),乳化剂 OP 的亲油基是烷基酚(辛基苯基聚氧乙烯醚)。发酵培养基中棉籽油的主要成分是亚油酸和油酸,根据相似相溶原理,Tween 80 更有利于棉籽油的乳化,增强脂肪酶的活力,促进菌体对植物油的分解利用,从而促进 β -胡萝卜素的合成。

根据 Tween 80、乳化剂 OP 和 Span 20 三者对三孢布拉霉发酵产 β -胡萝卜素的促进程度,可以推断,植物油的乳化对提高 β -胡萝卜素的产量更为重要。

2.5 Ethoxyquin 对 β -胡萝卜素发酵的影响

β -胡萝卜素为类萜化合物,其结构中含有许多双键,因此很容易被氧化,为了提高 β -胡萝卜素的产量,我们选择在发酵后期(发酵第 72 h 后)加入抗氧化剂 Ethoxyquin,浓度从 0.01%~0.1%。结果如图 5 所示,当 Ethoxyquin 浓度小于 0.025%, β -胡萝卜素产量随着 Ethoxyquin 浓度增大而逐渐升高;当 Ethoxyquin 的浓度大于 0.025%, β -胡萝卜素产量的增长幅度减弱;当 Ethoxyquin 浓度大于 0.05%,再增大 Ethoxyquin 浓度, β -胡萝卜素产量的增长幅度也基本不再变化。Ethoxyquin 作用的最佳浓度为 0.025%,在此浓度下, β -胡萝卜素产量的增长幅度最高,达 70%。

β -胡萝卜素有较强的抗氧化作用,可以保护菌体。Ethoxyquin 作为一种抗氧化剂,能保护 β -胡萝卜素不被氧化分解。图 5 的结果与 β -胡萝卜素和 Ethoxyquin 的抗氧化性质有关,一方面,Ethoxyquin 能保护菌体产生的 β -胡萝卜素不被氧化分解,在没有 Ethoxyquin 保护的情况下, β -胡萝卜素产量会因为氧化分解而降低;另一方面,在较高浓度下,其抗氧化作用会抑制菌体自身抗氧化剂—— β -胡萝卜素——的合成,而在较低浓度时,这

种抑制作用不明显。因此可以说图 5 的结果是 Ethoxyquin 对 β -胡萝卜素的保护作用与抑制作用平衡的结果。

另外,菌体量随着 Ethoxyquin 浓度的增加而逐渐增大,这是由于 Ethoxyquin 的抗氧化作用有利于菌体的生长。

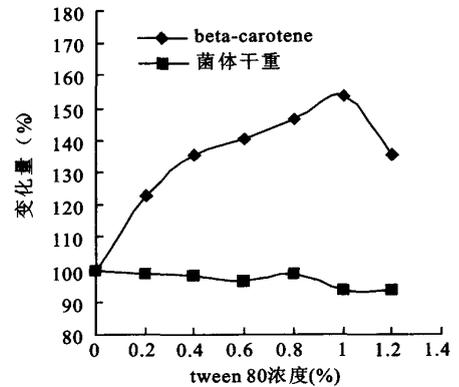


图 4 Tween 80 对发酵的影响

Fig. 4 Effect of Tween 80 on β -Carotene fermentation

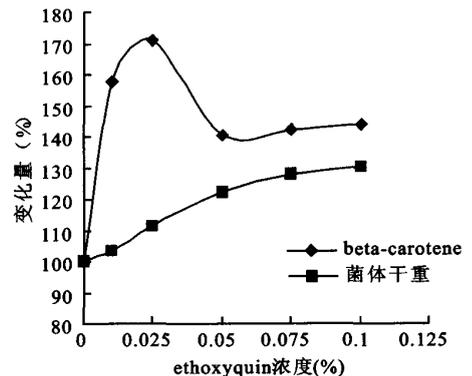


图 5 Ethoxyquin 对发酵的影响

Fig. 5 Effect of ethoxyquin on β -Carotene fermentation

3 结论

通过试验乳化剂 OP、Span 20、Tween 80 3 种表面活性剂对三孢布拉霉合成 β -胡萝卜素的促进作用,确定了三者的最佳作用浓度。实验结果表明 Tween 80 的促进作用最强,最佳浓度为 1%,此时 β -胡萝卜素产量的增长幅度最高达 50% 以上。乳化剂 OP 和 Span 20 的作用稍差,分别在 0.075% 和 0.05% 时促进作用最强, β -胡萝卜素产量的增长幅度分别达 15% 和 10%。在利用三孢布拉霉发酵生产 β -胡萝卜素时,植物油的乳化对提高 β -胡萝卜素的产量非常重要。抗氧化剂 Ethoxyquin 对 β -胡萝卜素产量的增长有显著作用,最佳浓度为 0.025%,

在此浓度下, β -胡萝卜素产量的增长幅度可高达70%。根据以上实验结果,在利用三孢布拉霉进行发酵生产 β -胡萝卜素时,可以在发酵培养基中选择

添加合适浓度的表面活性剂以及抗氧化剂,以提高三孢布拉霉的 β -胡萝卜素产量。

参考文献(References):

- [1] 张晓斌,高仰哲. β -胡萝卜素的应用及研究进展[J]. 中国饲料,2003,(3):27-24.
ZHANG Xiao-bin, GAO Yang-zhe. The application and research advances of the β -carotene[J]. China Feed. 2003, (3): 22-24. (in Chinese)
- [2] 曾强松,董海宝,徐静安. 三孢布拉塞发酵生产 β -胡萝卜素工艺研究[J]. 工艺微生物,2002,32(4):7-10.
ZENG Qiang-song, TONG Hai-bao, XU Jing-an. Studies on β -carotene production by *Blakeslea trispora* [J]. Industrial Microbiology. 2002, 32(4): 7-10. (in Chinese)
- [3] Chemistry reagents. Fine chemical product catalog[M]. Chemical industry press, 1999.
- [4] 彭纲. 微生物脂肪酸的研究进展[J]. 生物技术通报,1999,(2):17-22.
PENG Gang. Advances in the Research on Microbial Lipase[J]. **Biotechnology Information**, 1999, (2): 17-22. (in Chinese)
- [5] Pushalkar S, Rao KK, Menon K. Production of beta-glucosidase by *Aspergillus terreus*[J]. **Curr Microbiol**, 1995, 30(5): 255-8.
- [6] Jeong JC, Lee J, Park YH. A unique pattern of mycelial elongation of *Blakeslea trispora* and its effect on morphological characteristics and beta-carotene synthesis[J]. **Curr Microbiol**, 2001, 42(3): 225-8.
- [7] Baklashova TG, Koshcheenko KA. Effect of detergents on the hydroxylation of indolyl-3-acetic acid by an *Aspergillus niger* culture[J]. **Mikrobiologiya**, 1980,7-8;49(4):546-50.
- [8] Nemeč T, Jernejc K. Influence of Tween 80 on lipid metabolism of an *Aspergillus niger* strain[J]. **Appl Biochem Biotechnol**, 2002, 101(3): 229-238.

(责任编辑:杨萌)